

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Higiene e segurança alimentar em vegetais para  
consumo humano: comparação entre produtos de  
agricultura biológica e convencional**

Simone Guimarães Ferreira

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Teresa Rebelo (FCUL)  
Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca (FMV/ULisboa)

2016

"A terra não pertence ao homem...  
É o homem que pertence à terra".

Cacique Seattle

## **Nota prévia**

Este trabalho foi redigido não seguindo as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990.

As citações e referências bibliográficas efectuadas ao longo do trabalho encontram-se de acordo com as normas da revista *Letters in Applied Microbiology*.

## Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a intervenção e apoio de diversas pessoas. Primeiro, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Maria Teresa Rebelo e Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, por todo o apoio, simpatia, compreensão e ensinamentos ao longo deste percurso. Muito obrigada pela confiança depositada em meu trabalho.

À Doutora Lídia Gomes por todo os ensinamentos e também pelo auxílio na execução das técnicas laboratoriais.

Ao Professor Doutor Fernando Bernardo pela disponibilização do laboratório e materiais utilizados neste trabalho e à Doutora Anabela Lança por todo o auxílio prestado e pela simpatia.

Ao Mestre Aldo Matos, obrigada pelo interesse e auxílio depositados neste trabalho e pela preciosa ajuda na identificação de alguns dos parasitas encontrados.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho pela ajuda na caracterização dos nemátodes de vida livre, pela disponibilidade e simpatia.

À Professora Gabriela Silva, do CFPSA, pelas incríveis aulas de microbiologia e pela amizade.

Ao Professor Telmo Nunes, da FMV por toda a ajuda na análise estatística.

À todas as pessoas do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA) da FMV.

À Professora Doutora Deodália Dias, coordenadora do mestrado em Biologia Humana e Ambiente, por todos os esclarecimentos.

Aos meus amigos e colegas, obrigada pela amizade e por toda a força e confiança que depositaram em mim.

À toda a minha família, em especial, aos meus pais Marta e Olavo e aos meus irmãos Leonardo e Laerte, que sempre me apoiaram e proporcionaram condições para a finalização de mais esta etapa de minha vida.

A todos vocês, o meu Muito Obrigada!

## Resumo

O consumo de vegetais crus fornece nutrientes essenciais e muitos benefícios para uma dieta saudável. No entanto, podem também causar doenças intestinais, com um importante impacto na saúde humana. Além disso, devido aos perigos químicos associados a esses alimentos, nomeadamente pesticidas e metais pesados, tem havido um aumento do consumo de alimentos de origem biológica em todo o mundo. Considerando a escassez de estudos nesta temática, inclusive em Portugal, pretendeu-se com este trabalho contribuir para o maior conhecimento sobre a segurança microbiológica e parasitológica entre alimentos de cultivo biológico e convencional.

Foi avaliada a presença de coliformes termotolerantes e de *Escherichia coli* e a presença de protozoários e nemátodes em vegetais comercializados em mercados e feiras da Área Metropolitana de Lisboa. As variedades de vegetais avaliadas foram agrião, alface, cebolinho, couve-galega e espinafre, sendo amostradas 10 unidades de cada uma, sendo avaliadas 100 amostras, 50 de origem biológica e 50 de origem convencional.

Foram detectados valores de coliformes termotolerantes superiores ao limite máximo de quantificação da técnica utilizada em 21% das amostras, o equivalente a 14% (7/50) das amostras de origem biológica e 28% (14/50) de origem convencional. A contaminação por *E. coli* foi detectada em 56% das amostras, nomeadamente em 34% (17/50) das amostras de origem biológica e 78% (39/50) de origem convencional. Verificaram-se associações estatisticamente significativas no caso da presença de *E. coli* em vegetais de origem convencional e quanto à presença de valores elevados de coliformes termotolerantes e de contaminação fecal em amostras de cultivo convencional. Também foi observada uma associação entre a presença de *E. coli* e a proveniência das amostras, para os dois tipos de cultivo.

Quanto às análises parasitológicas, 45% das amostras (45/100) apresentaram contaminação por pelo menos um género de protozoário ou nemátode, tendo sido identificados 5 géneros: *Entamoeba*, *Amoeba*, *Balantidium*, *Paramecium* e *Colpoda*. Verificaram-se associações estatisticamente significativas quanto à presença de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) no caso da proveniência das amostras, para os dois tipos de cultivo. A proveniência das amostras também foi significativa quanto à prevalência de parasitas intestinais, para os dois tipos de cultivo. Também foi encontrada associação entre amostras contaminadas por protozoários e/ou nemátodes e ausência de contaminação fecal quanto ao cultivo biológico. Os resultados deste trabalho sugerem que a contaminação microbiana e parasitológica nos alimentos de origem biológica foi inferior à dos alimentos convencionais. Contudo, são necessários mais estudos para melhor avaliação dos critérios de qualidade sanitária destes alimentos.

Do que se sabe, este é um dos primeiros estudos em Portugal a relatar a presença de protozoários intestinais em vegetais para o consumo humano. Estes resultados contribuem de forma inequívoca para o conhecimento da segurança alimentar relacionada com o consumo de produtos hortícolas vendidos em mercados e feiras de agricultura biológica e convencional na Área Metropolitana de Lisboa.

**Palavras-chave:** Vegetais, Segurança Alimentar, Qualidade Microbiológica, Qualidade Parasitológica, Lisboa.

## Abstract

The consumption of raw vegetables provides essential nutrients and many benefits to a healthy diet. However, they can also cause intestinal diseases, with a significant impact on human health. In addition, due to the chemical hazards associated with these foods, namely pesticides and heavy metals, there has been an increase in the consumption of organic produce almost everywhere in the world. Considering the scarcity of studies in this subject, including in Portugal, this work was intended to contribute to a better knowledge about microbiological and parasitological safety between organic and conventional produce.

The presence of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and the presence of protozoa and nematodes in vegetables sold in open-aired markets of the Metropolitan Area of Lisbon were evaluated. Five varieties of vegetables were sampled: watercress, lettuce, chives, kale and spinach, 10 samples of each. In total, a hundred samples, 50 from organic and 50 from conventional origin were evaluated.

Thermotolerant coliform values were detected above the maximum detection limit of the technique in 21% of the samples, equivalent to 14% (7/50) of biological samples and 28% (14/50) from conventional samples. *E. coli* contamination was detected in 56% of the samples, namely 34% (17/50) from organic and 78% (39/50) from conventional origin. There were statistically significant associations between the presence of *E. coli* and conventional produce and between the presence of high values of thermotolerant coliforms and fecal contamination from conventional produce. Also it is reported an association between the presence of *E. coli* and the provenance of the samples, for both types of produce.

Also 45% of the samples (45/100) showed contamination by at least one genus of protozoa or nematode. Five genera were identified: *Entamoeba*, *Amoeba*, *Balantidium*, *Paramecium* and *Colpoda*. There were statistically significant associations regarding the presence of contamination (protozoa and/or nematodes) and the provenance of the samples, for both types of produce. The source of the samples was also significant related to the presence of intestinal protozoa, for both types of produce. It was also found an association between samples contaminated by protozoa and/or nematodes and the absence of fecal contamination in the biological produce. From this work, it can be assumed that microbiological and parasitological contamination in organic produce was lower than conventional produce. However, further studies are needed to better assess the quality criteria of organic produce.

From what is known, this is one of the first studies in Portugal that report the presence of intestinal protozoa on vegetables for human consumption. These results contribute undeniably to the knowledge of food safety related to the consumption of vegetables sold in markets from organic and conventional produce in the Metropolitan Area of Lisbon.

**Keywords:** Vegetables, Food Safety, Microbiological Quality, Parasitological Quality, Lisbon

# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Índice de Tabelas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de abreviaturas e símbolos.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Consumo e produção de hortaliças .....	1
1.2. Aspectos intrínsecos e hígio-sanitários na produção de hortaliças .....	2
1.3. DOA por consumo de vegetais crus.....	3
1.4. DOA por consumo de vegetais crus em Portugal .....	5
1.5. Agricultura Biológica.....	5
1.5.1. Comparação de práticas agrícolas entre as produções biológicas e convencionais .....	7
1.6. Microorganismos Indicadores de Higiene.....	7
1.7. Bactérias enteropatogénicas .....	8
1.7.1. Descrição dos principais géneros de bactérias enteropatogénicas em vegetais crus.....	9
1.8. Detecção de contaminação microbiana em vegetais crus.....	12
1.9. Parasitoses intestinais.....	12
1.10. Protozooses.....	13
1.10.1. Descrição dos diferentes géneros de protozoários intestinais e respectivos ciclos de vida.....	14
1.11. Protozoários de vida livre.....	21
1.11.1. <i>Amoeba</i> .....	21
1.11.2. <i>Colpoda</i> .....	21
1.11.3. <i>Paramecium</i> .....	22
1.12. Rotíferos .....	22
1.13. Protozoários de vida livre como potenciais vectores de bactérias patogénicas .....	23
1.14. Helminntoses .....	24
1.14.1. Descrição dos principais géneros de helmintes intestinais e respectivos ciclos de vida.....	24
1.15. Detecção de parasitas em vegetais .....	27
1.16. Objectivos.....	29
2. Material e Métodos.....	30



2.1. Obtenção das amostras - caracterização dos mercados em estudo .....	30
2.1.1. Agricultura biológica.....	30
2.1.2. Agricultura convencional.....	31
2.2. Recolha e acondicionamento das amostras.....	31
2.3. Processamento das amostras.....	31
2.3.1. Análises microbiológicas.....	31
2.3.2. Detecção de coliformes termotolerantes.....	31
2.3.3. Enumeração de coliformes termotolerantes.....	32
2.3.4. Detecção de <i>Escherichia coli</i> através do Teste do Indol.....	32
2.4. Análises parasitológicas .....	32
2.4.1. Técnica de Sedimentação Espontânea.....	33
2.4.2. Método de Faust.....	33
2.4.3. Preparação e fixação dos esfregaços para coloração Ziehl- Neelsen.....	34
2.4.4. Preparação e fixação dos esfregaços para coloração de Giemsa.....	35
2.4.5. Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Directa (IFD).....	35
2.5. Identificação dos géneros parasitários .....	37
2.6. Análise estatística .....	37
3. Resultados.....	38
3.1. Proveniência dos vegetais amostrados .....	38
3.2. Resultados das análises microbiológicas.....	38
3.2.1. Resultados da contagem de coliformes termotolerantes.....	38
3.2.2. Resultados do teste do indol.....	41
3.3. Resultados das análises parasitológicas .....	44
3.3.1. Resultados da pesquisa de parasitas.....	44
3.3.2. Resultado da pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp. pela coloração Ziehl – Neelsen.....	54
3.3.3. Resultado da pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Directa (IFD).....	55
4. Discussão.....	56
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	60
6. Referências bibliográficas.....	61
Anexos.....	78
Anexo I- .....	78
Anexo II - .....	79
Anexo III- .....	81

Anexo IV-	82
Anexo V –	83
Anexo VI -	84
Anexo VII-	85
Anexo VIII-	87
Anexo IX-	89
Anexo X-	90

## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Média e Desvio Padrão dos valores de coliformes termotolerantes ( $n=50$ ).....	39
Tabela 3.2- Frequência de amostras em relação a valores de coliformes termotolerantes $\geq 1,10 \times 10^3$ NMP/g. a) Origem biológica ( $n=50$ ); b) Origem convencional ( $n=50$ ).....	40
Tabela 3.3- Resultados do teste do indol. a) Origem biológica ( $n=50$ ); b) Origem convencional ( $n=50$ ).....	42
Tabela 3.4 – Frequência de <i>E. coli</i> entre as variedades de vegetais. ( $n=50$ ).....	42
Tabela 3.5 – Frequência de <i>E. coli</i> de acordo com a proveniência. Origem biológica ( $n=50$ ).....	43
Tabela 3.6 – Frequência de <i>E. coli</i> de acordo com a proveniência. Origem convencional ( $n=50$ ).....	43
Tabela 3.7 – Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) entre as variedades de vegetais. ( $n=50$ ).....	49
Tabela 3.8- Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) em amostras biológicas de acordo com a proveniência ( $n=50$ ).....	50
Tabela 3.9- Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) em amostras convencionais de acordo com a proveniência ( $n=50$ ).....	50
Tabela 3.10- Frequência de parasitas intestinais entre os diferentes mercados de origem biológica ( $n=50$ ).....	51
Tabela 3.11- Frequência de parasitas intestinais entre os diferentes mercados de origem convencional ( $n=50$ ).....	52
Tabela 3.12- Frequência de amostras contaminadas com no mínimo dois gêneros de protozoários e/ou nemátodes. a) Origem biológica ( $n=50$ ); b) Origem convencional ( $n=50$ ).....	54

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	14
Figura 1.2- Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i> .....	16
Figura 1.3- Quistos e trofozoítos de diferentes espécies de amebas.....	18
Figura 1.4- Ciclo de vida de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	19
Figura 1.5- <i>Amoeba</i> spp. encontrada em agrião de origem biológica.....	21
Figura 1.6- Trofozoíto de <i>Colpoda</i> spp. encontrado em alface de origem biológica.....	22
Figura 1.7- <i>Paramecium</i> spp. em microscopia de contraste de fase.....	22
Figura 1.8- Rotífero encontrado em agrião de origem biológica.....	23
Figura 1.9- Ciclo de vida de <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	25
Figura 2.1- Mapa com descrição da localidade dos mercados amostrados.....	30
Figura 2.2- Tubos graduados com sedimento obtido das amostras.....	33
Figura 2.3 – Esfregaço antes da coloração de Ziehl-Neelsen.....	34
Figura 2.4- <i>Kit</i> comercial Crypto/Giardia Cel®.....	35
Figura 2.5- Lâminas para imunofluorescência Argene® (a) e lâmina com poços (b).....	36
Figura 3.1 – Percentagem de vegetais amostrados consoante a proveniência ( <i>n</i> =100).....	38
Figura 3.2- Prova confirmatória de coliformes termotolerantes pelo NMP.....	39

Figura 3.3 - Relação entre o número de amostragem e de amostras positivas para coliformes com contagens elevadas em vegetais biológicos (n=50).....	40
Figura 3.4 - Relação entre o número de amostragem e de amostras positivas para coliformes com contagens elevadas em vegetais convencionais (n=50).....	41
Figura 3.5- Resultados do teste do indol.....	41
Figura 3.6 – Aspecto dos diferentes protozoários observados.....	44
Figura 3.7- Quisto de <i>Entamoeba coli</i> .....	46
Figura 3.8– Aspecto de alguns dos protozoários de vida livre observados.....	46
Figura 3.9– Aspecto das diferentes larvas de nemátodes e ovos observados.....	47
Figura 3.10 – Aspecto de alguns dos rotíferos observados.....	48
Figura 3.11- Frequência de contaminação em vegetais de origem biológica (n=50).....	48
Figura 3.12- Frequência de contaminação em vegetais de origem convencional (n=50).....	49
Figura 3.13- Número de amostras com parasitas intestinais em relação à variedade de vegetal (n=12).....	51
Figura 3.14- Frequência de protozoários e nemátodes em amostras de origem biológica (n=50).....	53
Figura 3.15- Frequência de protozoários e nemátodes em amostras de origem convencional (n=50).....	53
Figura 3.16- Frequência de protozoários e nemátodes. a) Origem biológica (n= 50); b) Origem convencional (n= 50).....	54
Figura 3.17 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. após coloração Ziehl – Neelsen.....	55
Figura 3.18- Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (seta laranja) e quistos de <i>Giardia</i> spp. (seta azul) por IFD em lâmina de controlo positivo, 400x.....	55

## Índice de abreviaturas e símbolos

%	Percentagem
°C	Graus Celsius
©	<i>Copyright</i>
®	Registada
g	Gramas
g/ml	Gramas por Mililitro
mm	Milímetros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
<i>n</i>	Número observado
<i>p</i>	<i>p-value</i>
$\chi^2$	Valor de <i>Qui-Quadrado</i>
i.e.	Isto é
nº	Número
AGROBIO	Associação Portuguesa de Agricultura Biológica
APHA	American Public Health Association
<i>B.</i>	<i>Balantidium</i>
<i>C.</i>	<i>Cryptosporidium</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Comunidade Europeia
CEE	Comunidade Económica Europeia
CML	Câmara Municipal de Lisboa
CONTROL+	Lâmina de controlo positivo
CVBLB	Caldo Verde Brilhante Lactose BÍlis

DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DOA	Doença(s) de Origem Alimentar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxinogénica
EUA	Estados Unidos da América
<i>F.</i>	<i>Fasciola</i>
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FMV/ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
<i>G.</i>	<i>Giardia</i>
HD	Hospedeiro(s) definitivo(s)
IFD	Imunofluorescência Directa
ISO	International Organization for Standardization
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	Número Mais Provável
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrogénio
Reg.	Regulamento
rpm	Rotações por minuto
RMG	Meio de montagem
RR2	Reagente Crypto/Giardia Cel
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
sp.	Espécie
spp.	Espécies
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
<i>T.</i>	<i>Taenia</i>
UE	União Europeia
USDA	United States Department of Agriculture
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco
WHO	World Health Organization

# 1. Introdução

## 1.1. Consumo e produção de hortaliças

O consumo de vegetais frescos faz parte de uma dieta saudável fornecendo muitos dos nutrientes que o corpo necessita, como as vitaminas, os minerais e os antioxidantes (Jung *et al.*, 2014). O consumo regular de frutas e vegetais é altamente recomendado e muitos estudos epidemiológicos apontam que uma dieta rica nestes alimentos, é capaz de prevenir o aparecimento e a progressão de doenças cardiovasculares, uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo (Ignarro *et al.*, 2007) inclusive em Portugal (Ribeiro *et al.*, 2012). É de se destacar também o papel preventivo destes alimentos no aparecimento do cancro e de outras doenças (Qadri *et al.*, 2015).

Contudo, tem sido reportado um aumento nos casos de surtos de origem alimentar devido ao consumo destes alimentos (Jung *et al.*, 2014). O crescimento da importação e globalização do fornecimento de alimentos, além das mudanças nos hábitos alimentares (aumento do consumo de refeições fora de casa incluindo, muitas vezes, saladas, frutos e vegetais crus), são alguns dos factores encadeadores deste aumento (SCF, 2002). As mudanças climáticas actuais também podem potenciar a resistência dos patógenos no solo, água e nas plantações, propiciando riscos à saúde humana (Jung *et al.*, 2014).

A União Europeia é o maior importador do mundo de frutas e vegetais, com um consumo de milhões de toneladas anuais. Os principais alimentos importados são: banana, frutas cítricas, maçã, pêra, ananás, cebola, tomate, *kiwi* e melão (SCF, 2002). Em Portugal, o vinho, os frutos (frutos frescos, citrinos, frutos tropicais, uvas de mesa) e os produtos hortícolas frescos são os três principais produtos de produção agrícola sendo que o grau de auto-suficiência em produtos hortícolas frescos no país, em anos normais, é elevado (Direcção-Geral de Agricultura, 2002). Infelizmente, muitos destes produtos hortícolas destinam-se ao consumo em fresco, o que pode potenciar o aparecimento de Doenças de Origem Alimentar (DOA) (FAO/WHO, 2008) tendo grandes implicações na saúde pública (Jung *et al.*, 2014). Na Europa, por exemplo, de 2008 a 2011, foi reportado um aumento nos casos de surtos associados a alimentos de origem vegetal, como folhas verdes, frutas, ervas aromáticas, frutos secos, entre outros (EFSA, 2013b). Além disso, os vegetais de folhas verdes (alface, espinafre, couve, chicória) e as ervas aromáticas com folhas (salsa, coentros, manjeriço e agriões) são consideradas as mercadorias de primeira prioridade no que se refere aos perigos microbiológicos (FAO/WHO, 2008; Veiga *et al.*, 2009). As bagas (morangos, mirtilos, amoras, framboesas), o cebolinho, os melões, as sementes germinadas (rebolos) e os tomates são os segundos do *ranking* de maior prioridade em termos de perigos microbiológicos. O cebolinho está incluído devido à sua morfologia peculiar, que favorece a proliferação microbiana, pois o interior do tubo deste alimento é propício à contaminação, sendo que a lavagem é muitas vezes ineficaz (Veiga *et al.*, 2009).

Devido à necessidade e obrigação legal de produzir alimentos seguros é inevitável a implementação de sistemas de segurança alimentar, com o objectivo de assegurar que os géneros alimentícios são seguros, ou seja, que não causam nenhum dano à saúde de todos os consumidores, incluindo os mais sensíveis, nem a curto nem a longo prazo, e por outro lado, não podem encontrar-se impróprios para o consumo humano



por motivos de contaminação interna ou externa, deterioração, putrefação ou decomposição (Reg. (CE) nº 178/2002). Os perigos da segurança alimentar podem ser de origem biológica, química ou física, sendo bactérias e parasitas os mais comuns (Chau *et al.*, 2014).

Os alimentos frescos contêm naturalmente um certo número de microorganismos que normalmente não apresenta qualquer grau de patogenicidade, entretanto, até serem disponibilizados aos consumidores, estes alimentos passam por uma série de etapas que vão desde o crescimento, colheita, processamento, transporte, transformação e manipulação até a distribuição e comercialização, sendo estas etapas, passíveis de contaminação (FAO/WHO, 2008). Com isso, a indústria alimentar tem de monitorizar e controlar toda a cadeia de produção, desde o campo até o destino final, que são os consumidores (Hohweyer *et al.*, 2016).

## **1.2. Aspectos intrínsecos e hígio-sanitários na produção de hortaliças**

As bactérias intrínsecas à flora microbiana do alimento, que, usualmente, não apresentam patogenicidade ocorrem na superfície dos frutos e vegetais. A maioria delas são Gram-negativas e pertencem ao grupo das *Pseudomonas* ou das *Enterobacteriaceae*. Geralmente, não penetram nos tecidos internos dos vegetais, sendo estes considerados estéreis (Lund, 1992). Com isso, a superfície dos frutos e vegetais é o local mais propício para a contaminação microbiana e a sobrevivência e o crescimento depende de factores intrínsecos e extrínsecos, tais como a composição nutricional do alimento, o pH, a presença de fibras, presença de água, o potencial redox, a temperatura e a atmosfera envolvida. O processamento dos alimentos também pode influenciar o aparecimento de microorganismos, expondo a superfície do mesmo através de processos mecânicos como cortes, descascamento e fatiamento. Além disso, pode ocorrer penetração de bactérias em número reduzido, em resultado da absorção de águas de irrigação ou de certos procedimentos de lavagem no alimento (SCF, 2002).

Os vírus e os parasitas estão presentes em baixas concentrações e não se multiplicam no alimento, usando-o apenas como meio de transporte para alcançarem o hospedeiro. Contudo, as bactérias são transportadas na superfície dos vegetais e, no processo de descasque são transferidas para a parte interna, podendo multiplicar-se ao encontrarem condições ideais. Devido a sua rápida multiplicação são, na maioria das situações, os microorganismos numericamente predominantes nos alimentos (Jaykus, 1997). A acumulação e a adesão dos microorganismos também pode variar conforme a morfologia do vegetal, sendo que aqueles com folhas largas, como a alface terão mais proximidade com o solo e a água de irrigação (Abadias *et al.*, 2008). A adesão é uma etapa fundamental para a colonização e transmissão de organismos patogénicos através do alimento, sendo crucial na contaminação dos frutos e vegetais visto que, mesmo com procedimentos de lavagem é muito difícil a eliminação dos patógenos associados (Beuchat & Scouten, 2002). Também, as funções metabólicas das plantas (frutos, flores, folhas, raízes) podem propiciar o aparecimento de comunidades específicas de certos organismos (Buck *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm investigado as possíveis fontes de contaminação que afectam a cadeia alimentar, desde a fase da pré-colheita (crescimento do alimento) até a fase de pós-colheita. Antes da colheita, há uma série de variáveis que influenciam à contaminação dos vegetais, como por exemplo, o solo e a água de irrigação utilizada, uso de adubos e fertilizantes inadequadamente decompostos, a água usada para aplicação de fungicidas e insecticidas, pó, presença de insectos, a utilização de resíduos animais

contaminados, a presença de animais (selvagens ou domésticos) e a manipulação humana (Beuchat, 1996).

O solo, a água de irrigação e os fertilizantes orgânicos, são as fontes mais comuns de contaminação nesta fase. O solo é um reservatório de inúmeros microrganismos, sendo a maioria deles de origem não patogénica, no entanto, também abriga organismos patogénicos, que podem muitas vezes ser de origem humana ou animal. A água também é uma importante fonte de contaminação por protozoários, vírus e bactérias (SCF, 2002) e práticas como a utilização de águas residuais para a irrigação de plantações, muito comum em alguns países em desenvolvimento, também podem agravar esta situação (Jung *et al.*, 2014). Os fertilizantes tais como estrume de origem animal, muitas vezes são utilizados na produção de vegetais, principalmente em sistemas de produção biológica e têm grande potencial de contaminação (SCF, 2002). Contudo, a origem do fertilizante utilizado, o método de aplicação, a frequência de aplicação e o período entre a aplicação e plantio ou colheita do alimento podem influenciar no risco de ocorrência de doença causada por agentes patogénicos alimentares (FAO/WHO, 2014).

Durante a colheita, tanto as frutas quanto os vegetais, podem contaminar-se devido a manipulação humana ou durante o transporte, e os danos mecânicos também propiciam a contaminação e levam a frequentes perdas (Beuchat, 1996). Na pós-colheita, antes de serem disponibilizados ao consumidor final, os alimentos passam por manipulação humana, armazenamento, lavagem, transporte e distribuição, sendo que a contaminação é passível de ocorrer em qualquer uma dessas fases. As condições ambientais e de transporte também influenciam a qualidade higiénica do produto antes do processamento ou consumo (SCF, 2002).

### **1.3. DOA por consumo de vegetais crus**

As toxinfecções alimentares são divididas em dois grupos: infecções alimentares, causadas por microrganismos patogénicos que multiplicam-se no tracto gastro-intestinal do hospedeiro, após a ingestão dos alimentos contaminados, e as intoxicações alimentares, que ocorrem pela ingestão de toxinas presentes em um alimento e que são produzidas por bactérias e outros microrganismos. De acordo com a Directiva 2003/99/EC um surto de origem alimentar ocorre quando dois ou mais indivíduos apresentam a mesma doença ou infecção, fazendo com que os casos, suspeitos ou confirmados, estejam ligados ou tenham origem comum; a sua declaração é obrigatória. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) é o organismo da União Europeia que visa fornecer ao público pareceres científicos independentes sobre a segurança alimentar e os riscos possíveis na cadeia alimentar. Os surtos de doenças de origem alimentar são classificados em duas categorias: surto com “evidência forte” quando existe evidência robusta da implicação de um determinado alimento e “evidência fraca” quando não é possível implicar qualquer alimento, ou, quando as evidências são fracas. Na Europa, em países como Alemanha, Finlândia, Dinamarca, Noruega, Suécia e Inglaterra, a alface tem sido o alimento mais implicado como veículo de infecção, nomeadamente por várias estirpes de *Salmonella* spp. (EFSA, 2013b). *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. permanecem como os protozoários de maior frequência nos países da UE (Fernandes *et al.*, 2012).

A dose infectante consiste no número mínimo de microorganismos necessários para causar a doença, podendo no entanto, variar de indivíduo para indivíduo, até porque tem-se observado um aumento de toxinfecções alimentares em países desenvolvidos devido ao crescente número de pessoas idosas, imunocomprometidas ou portadoras de doenças crônicas (Beuchat *et al.*, 1998).

Os vírus que causam infecções alimentares são de origem entérica, sendo transmitidos por ingestão de água ou alimentos contaminados e por contacto de pessoa a pessoa. O vírus da hepatite A e o vírus de Norwalk são dos mais comuns (SCF, 2002). Na maior parte dos casos, as gastroenterites não são graves e duram pouco tempo. Os protozoários mais frequentemente associados a surtos de infecções alimentares nos frutos e vegetais são *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp. e *Cyclospora cayetanensis*, sendo que a contaminação está essencialmente relacionada com uso de água sem tratamento ou por contaminação pelos próprios manipuladores. Normalmente provocam diarreias, agudas ou crônicas (Harris *et al.*, 2003). Contudo, os microorganismos frequentemente associados a surtos, com origem em vegetais e fruta fresca, são bactérias, em especial *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) de serótipos (O104:H4 e O157:H7), além de *Salmonella enterica*. Outros casos, porém de menor frequência estão relacionados com *Listeria monocytogenes* e *Shigella sonnei* (Yeni *et al.*, 2015).

No ano 2000, foi reportado na Alemanha o primeiro surto ocorrido na Europa Central devido à contaminação por *Cyclospora cayetanensis*. Este ocorreu em um restaurante e os únicos alimentos associados foram a alface e algumas ervas frescas importadas do Sul da Europa. Aparentemente estes alimentos estavam contaminados com matéria fecal de origem humana (Doller *et al.*, 2002). Também foram reportados, com menor frequência, surtos de *Salmonella* spp. veiculados por rúcula e espinafre (EFSA, 2013b). Em 1997, ocorreu nos EUA um surto de *Cyclospora cayetanensis* devido a ingestão de manjerição, alguns anos depois, em 2001 ocorreu um surto semelhante no Canadá (FAO/WHO, 2008). Também foram reportados dois surtos devido a ingestão de cebolinho, um devido a contaminação por *Shigella flexneri* e outro por *Cryptosporidium parvum* (WHO, 1998). Quanto ao agrião, já ocorreram dois surtos devido a *Fasciola hepatica*, no Reino Unido (em 1970) e em França (em 2002), em ambos os casos a água estava contaminada por fezes de bovinos e ovinos e apresentava má qualidade sanitária. Em 1990, ocorreu um pequeno surto de *Giardia duodenalis* em um grupo de funcionários de uma empresa de seguros nos EUA; a fonte de contaminação foi proveniente de vegetais servidos crus e cortados às fatias por uma pessoa infectada com *Giardia*. Também nos EUA, ocorreu em 2006 um surto por *E.coli* Verotoxigenica (VTEC) O157: H7 em espinafres, as análises revelaram que o alimento estava contaminado com fezes de javalis selvagens (FAO/WHO, 2008).

Ainda há pouca informação quanto a presença de surtos alimentares provenientes de alimentos de origem biológica. Entre 1992 a 2014 foram reportados 18 surtos nos EUA, sendo que 56% ocorreram entre 2010 a 2014. As bactérias patogénicas com maior prevalência foram *Salmonella* sp. (44% dos casos) e *Escherichia coli* O157:H7 (33%). Os alimentos envolvidos foram produtos lácteos sem pasteurização, ovos, frutos secos, sementes e alimentos prontos a consumir (Harvey *et al.*, 2016).

## 1.4. DOA por consumo de vegetais crus em Portugal

Apesar da notificação de surtos de origem alimentar ser obrigatória na UE desde 2005, os dados disponíveis referentes a Portugal são escassos pois muitos estão subdetectados ou subnotificados. Além disso, apenas algumas DOA são de declaração obrigatória, são elas: (salmonelose, brucelose, botulismo, febres tifóide e paratifóide, hepatite A aguda e shigelose) (Veiga *et al.*, 2009). Em 2014, por decisão do Ministério da Saúde e da Direcção-Geral da Saúde, outras doenças como a giardiose e a criptosporidiose foram incluídas na lista de Doenças de Declaração Obrigatória em Portugal (Júlio & Oleastro, 2014). Os agentes etiológicos identificados nos anos de 2008 até 2011, foram *Salmonella*, toxina de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, e *Clostridium* spp., não especificado), *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* (EFSA, 2012; EFSA, 2013a).

No caso da giardiose, não existem registos de surtos de infecção em Portugal continental. O único registo publicado ocorreu num grupo de viajantes a ilha da Madeira a bordo de um cruzeiro em 1976. O surto foi associado ao consumo de água da rede, ingestão de gelados e saladas (Lopez *et al.*, 1978).

Quanto ao parasita *Cryptosporidium* spp., sabe-se que a contaminação hídrica é a mais provável, já foram detectadas concentrações significativas deste parasita nos rios no norte de Portugal, sendo necessária monitorização da água (Almeida *et al.*, 2010).

No caso da fasciolose, o número de indivíduos infectados aumentou significativamente desde 1980, e várias áreas geográficas têm sido descritas como endémicas para a doença (Norte de Portugal), contudo, continua a ser uma parasitose pouco frequente, pelo menos no centro do país. Em Portugal, o agrião (*Sisymbrium nasturtium aquaticum*), ingerido cru, é o principal veículo para esta parasitose (Calretas & Carvalho, 2003).

Os estudos de prevalência de enteroparasitoses em Portugal, assim como em muitos outros países da Europa são reduzidos, contudo pode-se dizer que a taxa de parasitismo no país é muito baixa. No entanto, na década de 80 e até finais da década de 90, a prevalência de helmintoses em Portugal era significativa sendo reduzida drasticamente a partir do ano 2000 para cerca de 3%. A prática de desparasitação, que tornou-se rotineira e a progressiva melhoria das condições de higiene foram imprescindíveis para esta drástica mudança. Além disso, mesmo em casos de portugueses parasitados com helmintes, pode-se observar uma baixa intensidade de parasitismo, ou seja, um reduzido número de parasitas por indivíduo (Salgado & Gata, 2013).

## 1.5. Agricultura Biológica

Apesar da existência de muitos métodos diferentes usados na agricultura, pode-se dizer que os sistemas agrícolas podem ser classificados em sustentáveis ou convencionais, de acordo com as técnicas utilizadas. O termo biológico refere-se à maneira de como os alimentos são cultivados e processados. As origens desta prática remontam ao período de 1920, tendo depois sido espalhada por todo o mundo. A

agricultura biológica não permite o uso de fertilizantes sintéticos, adubos químicos ou OGM, sendo uma prática que melhora a fertilidade do solo através da maximização da utilização eficiente dos recursos locais, incentivando a rotação de cultura, compostagem, adubação verde e o controlo biológico de insectos e doenças. São práticas agrícolas com base nos ciclos ecológicos tentando assim, minimizar o impacto ambiental da indústria de alimentos e o uso de recursos não renováveis (Gomiero *et al.*, 2011).

A acumulação de pesticidas na cadeia alimentar causa transtornos e modificações ao ambiente, sendo os seres humanos também afectados, uma vez que, a contaminação da água e do solo interfere directamente na qualidade de vida humana. Os pesticidas podem afectar a saúde humana a curto prazo (intoxicação aguda) ou a longo prazo (intoxicação crónica) comprometendo em especial o sistema reprodutivo, respiratório, imunológico e cutâneo (Ribas & Matsumura, 2009). Com isso, o interesse por produtos provenientes de agricultura biológica tem aumentado nos últimos anos verificando-se um grande crescimento em quase todo o mundo. Alguns países, como a Noruega, têm aderido cada vez mais à agricultura biológica e planejam que cerca de 15% da produção alimentar até 2020 seja de origem biológica. Este objectivo seria para responder a grande procura por este tipo de alimentos no país e também devido aos benefícios ambientais (Serikstad *et al.*, 2013). No entanto, apesar da maior segurança oferecida pelos alimentos provenientes deste tipo de agricultura, não há consenso sobre a segurança microbiológica destes alimentos, havendo muito poucos estudos nessa área (Maffei *et al.*, 2013).

A agricultura biológica é regulada por órgãos institucionais nacionais e internacionais, que certificam os alimentos desde a produção, manipulação e processamento. Na Europa, por exemplo, existe um forte quadro regulamentar (desde o início dos anos 90) que garante um sistema de rigor e de procedimentos harmonizados em todos os países envolvidos para possibilitar a segurança alimentar destes alimentos. Somente com o cumprimento das legislações em vigor pode ser obtida a certificação para os fornecedores e, com isso, a autorização para colocar os produtos à venda como um produto de agricultura biológica. A existência no rótulo da menção “Agricultura Biológica – Sistema de Controlo CE”, garante ao consumidor que, em toda a linha produtiva, foram utilizadas as regras estabelecidas pela regulamentação para este modo de produção. Nomeadamente, que o produtor foi sujeito a um regime de controlo por um organismo privado de certificação que garante que foram usadas as melhores práticas agrícolas que levam ao cumprimento das regras da agricultura biológica que abrangem também o respeito ao ambiente, aos animais e ao trabalhador (Comissão Europeia, 2001). O referencial europeu da agricultura biológica é constituído pelos Regulamentos (CE) nº 834/2007 (relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos) e o Regulamento (CE) nº 889/2008 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) nº 834/2007, no que respeita à produção biológica, à rotulagem e ao controlo. Desde 01/07/2012 é obrigatória a utilização do logótipo europeu da agricultura biológica, nos produtos aplicáveis ao mesmo (Sativa, 2004) (Anexo I).

Em Portugal a AGROBIO, fundada em 1985, é uma instituição que protagoniza a divulgação da agricultura biológica em Portugal. Apesar de ser um dos países da UE com das mais reduzidas quotas deste mercado, Portugal tem apresentado uma procura crescente de produtos biológicos, aumentando o número de lojas e feiras nas grandes superfícies e lojas de saúde (IFOAM, 2011). O processo de compra de produtos biológicos é condicionado por um conjunto de factores que vão desde preocupações ambientais, segurança alimentar, bem-estar animal, apoio a economias locais, entre outros (Hughner *et al.*, 2007).

### **1.5.1. Comparação de práticas agrícolas entre as produções biológicas e convencionais**

De acordo com as regras do modo de produção biológico deve-se procurar manter ou melhorar a fertilidade dos solos através da utilização de fertilizantes verdes provenientes do cultivo de leguminosas e de plantas com um sistema radicular profundo. Também é utilizado o estrume animal proveniente da produção biológica de animais e de matérias orgânicas de compostagem, produzidas em explorações que respeitem o modo de produção biológico. Também é feito o uso de fertilizantes orgânicos ou minerais (apenas alguns permitidos no regulamento do modo de produção) sendo que nenhum deles é de síntese química. Para o controlo de pragas e ervas daninhas são permitidos apenas determinados produtos de origem animal ou vegetal, produtos à base de microrganismos e algumas substâncias utilizadas na agricultura biológica já antes da adopção do Regulamento (CEE) n.º 2092/91 (Comissão Europeia, 2001).

Os fertilizantes orgânicos, tais como resíduos de animais, são comumente utilizados na produção de vegetais, especialmente nos sistemas de produção biológica (McMahon & Wilson, 2001; Mukherjee *et al.*, 2004). Apesar de já reportado o aparecimento de bactérias, parasitas e vírus em estrume de animais domésticos e selvagens (FAO/WHO, 2008) as regras estipuladas para os alimentos biológicos certificados somente permitem o uso de resíduos animais como fertilizantes orgânicos se estes passarem pelo processo de compostagem (que implica a realização de procedimentos específicos e que comprovadamente reduzem a probabilidade de patogénios, especialmente bactérias) como a submissão do material orgânico a temperaturas elevadas, o que desencoraja a aplicação directa de estrume animal em plantações de vegetais sem tratamento prévio (McMahon & Wilson, 2001). Além disso, o uso de resíduos animais é um método ecológico, que permite a diminuição de restos orgânicos a serem depositados nas águas superficiais e subterrâneas (FAO/WHO, 2008). Com isso, pode-se dizer que as principais diferenças do cultivo biológico em relação ao convencional são o uso de esterco animal e a proibição de pesticidas visto que, as práticas de agricultura convencional são baseadas na maximização da produção a partir da monocultura, por meio do uso de adubos sintéticos, pesticidas, fertilizantes químicos e OGM.

### **1.6. Microorganismos Indicadores de Higiene**

"Microorganismos indicadores" são grupos ou espécies de microrganismos que, se presentes num alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, provável presença de organismos patogénicos, deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas (durante o processamento, produção ou armazenamento) (Health Protection Agency, 2009). Os microorganismos indicadores de higiene estão reunidos em dois grupos: 1) microrganismos que não oferecem um risco directo à saúde: mesófilos, psicrotróficos, termófilos e bolores e leveduras e 2) microrganismos que oferecem um risco baixo ou indirecto à saúde: coliformes totais, *Enterococcus*, enterobactérias, *Escherichia coli* (ICMSF, 1986).

### 1.6.1.1. Enterobacteriaceae

Os coliformes totais englobam um grupo de bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae (aeróbias ou anaeróbias) que podem ser provenientes do tracto intestinal de animais ou de humanos, bem como de plantas e outros ambientes, sendo por isso, usadas para se avaliar critérios de higiene (NSW Food Authority, 2009). Incluem-se neste grupo as bactérias pertencentes aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas a 37°C por 48 horas (Environment Agency, 2002). Não é um grupo utilizado como indicador de qualidade microbiológica em produtos hortícolas, pois faz parte da microbiota nativa destes alimentos, sendo encontrado em níveis elevados em saladas. Já os coliformes termotolerantes habitam o tracto intestinal de vários animais e são usados como indicadores da qualidade e da presença de outros organismos causadores de problemas para a saúde (NSW Food Authority, 2009).

### 1.6.1.2. Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes termotolerantes correspondem aos coliformes totais que, quando incubados a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  em 24 horas apresentam a capacidade de continuar a fermentar a lactose com produção de gás. Este grupo é constituído quase exclusivamente por *Escherichia coli* (Conte *et al.*, 2004). Sabe-se que *E. coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal pois vive durante pouco tempo fora do ambiente entérico. A sua presença nos alimentos indica contaminação recente e, portanto, condições higiénicas insatisfatórias (NSW Food Authority, 2009).

## 1.7. Bactérias enteropatogénicas

Quanto aos vegetais destinados a serem consumidos crus, a maioria dos casos de contaminação de origem bacteriana são causados por *Salmonella* (Doyle, 1990), *Escherichia coli* (Nguyen-the & Carlin, 1994) e *Listeria monocytogenes* (Schlech *et al.*, 1983). Todos estes microorganismos já foram isolados de vegetais crus e podem contaminá-los durante a fase de crescimento, durante a colheita ou na fase de pós-colheita (Abadias *et al.*, 2008).

Nos EUA (entre 1996 a 2010), cerca de 23% dos surtos alimentares reportados foram casos de contaminação por vegetais estando as bactérias (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7) envolvidas em 86,5% dos casos. Registaram-se ainda 11,6% dos surtos devido a parasitas e 1,9% por vírus, sendo os rebentos e as hortaliças folhosas os alimentos mais afectados (Jung *et al.*, 2014). Em Portugal, existem várias entidades com competência na área da segurança alimentar e saúde pública, sendo o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), a única entidade que reporta esses dados internacionalmente.

Alguns estudos demonstram que várias bactérias patogénicas como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157H:7 e *Listeria monocytogenes* apresentam a capacidade de sobreviver e de multiplicar-se em vários

tipos de soluções com pesticidas comerciais. Isso porque muitos pesticidas são reconstituídos em água que pode estar contaminada, sendo que muitas soluções de pesticidas não inibem o crescimento destes microorganismos (Guan *et al.*, 2001, 2005; Ng *et al.*, 2005). Em oposição, Pham *et al.* (2004) alegam que alguns pesticidas podem destruir algumas bactérias, como por exemplo, *E. coli*.

### **1.7.1. Descrição dos principais géneros de bactérias enteropatogénicas em vegetais crus**

#### **1.7.1.1. *Salmonella***

As bactérias do género *Salmonella* pertencem a família das Enterobacteriaceae, são em forma de bacilos, Gram negativas, anaeróbicas facultativas e não formam esporos. Há duas espécies causadoras de doenças gastrointestinais em humanos: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que *S. enterica* é uma das espécies mais alarmantes em saúde pública em todo o mundo. Tanto seres humanos como animais infectados servem de reservatório comum da salmonelose. A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* e também possui mais de 2500 serótipos, sendo os mais conhecidos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhi* (FDA, 2012).

Os alimentos de origem animal estão directamente implicados na maior parte dos casos de contaminação, no entanto, as frutas frescas e vegetais têm apresentado notoriedade nos últimos anos em surtos de origem alimentar, devido a contaminação de águas e efluentes usadas para irrigação através do uso de resíduos animais como fertilizantes (Viegas, 2009). A maioria das DOA nos EUA são causadas por esta bactéria (FDA, 2012). Na Europa, a salmonelose também é comum e está muito associada aos vegetais de folhas verdes (EFSA, 2013b). Vários serótipos de *S. enterica* foram reportados em alimentos de origem vegetal, inclusive folhas como coentros e alfaces (Campbell *et al.*, 2001; Horby *et al.*, 2003).

As doenças causadas por *Salmonella* são subdivididas em febre tifóide, causada por *S. typhi*, febre paratifóide, causada por *S. paratyphi* e gastroenterites ou salmoneloses, causadas pelos serótipos restantes. A dose infectante geralmente é baixa e toda a população pode contrair estas infecções, contudo, crianças, idosos e imunocomprometidos são grupos de maior risco. A gravidade da doença depende do serótipo da bactéria, da idade e do estado de saúde do indivíduo (FDA, 2012). Em Portugal, a salmonela é também das bactérias mais comuns em casos de DOA. Na Europa, ocorreu um declínio no período de 2008 a 2011 quanto ao número de surtos de salmonelose, sendo que em 2012 ocorreu um ligeiro aumento, permanecendo contudo, como a bactéria causadora de DOA mais frequente (EFSA, 2015a).

#### **1.7.1.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é definida pela UE como um microorganismo indicador de contaminação fecal em alimentos (Campos *et al.*, 2013), no entanto, a maioria das estirpes não são patogénicas, fazendo parte da flora intestinal do homem e de muitos animais (SCF, 2002). Este facto permite que este microorganismo seja um bom indicador pois geralmente é encontrado em maior quantidade do que organismos patogénicos, sendo também de fácil e rápida identificação nos produtos alimentares (Health Protection Agency, 2009). Normalmente estas bactérias vivem em simbiose no organismo humano, podendo suprimir



o crescimento de bactérias perigosas (Viegas, 2009). No entanto, há algumas estirpes patogénicas, que provocam doença em pessoas imunocompetentes devido à aquisição de factores de virulência, como certos mecanismos de adesão às células e produção de toxinas.

As estirpes de *E. coli* patogénicas, também chamadas de diarreiogénicas, ou enterovirulentas, estão divididas em seis categorias principais: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) que são diferenciadas com base na sua patogenia e presença de factores de virulência específicos. Os primeiros quatro grupos são os comuns a nível mundial, com transmissão através de água ou alimentos contaminados. O grupo enterohemorrágico (EHEC) é o mais frequente de todos, com surtos de origem alimentar em todo o mundo (FDA, 2012).

As ETEC são conhecidas como causadoras da diarreia dos viajantes pois causam importantes gastroenterites em humanos e também diarreias em crianças, em países em desenvolvimento. Esta bactéria coloniza o intestino delgado e produz vários factores de virulência, além de toxinas termoestáveis e termolábeis. A dose infectante é alta, cerca de dez milhões a dez bilhões de células. No entanto, doses menores podem causar doença em crianças. No geral, a doença é limitada e apenas considerada uma DOA grave em países com baixos padrões de higiene (Viegas, 2009). Os alimentos podem ser contaminados devido a manipulação por indivíduos infectados ou devido a ingestão ou utilização de água contaminada com dejectos de portadores assintomáticos. Além de muitos alimentos de origem animal, as saladas são alimentos de risco (FDA, 2012).

As EPEC não produzem enterotoxinas, mas causam diarreia em crianças de países em desenvolvimento e com práticas de pouca higiene em doses infecciosas potencialmente baixas. Este microrganismo tem a capacidade de colonizar o intestino agregando-se nas microvilosidades, no entanto, não causa invasão dos tecidos. Os adultos são menos susceptíveis e necessitam de altas doses infectantes. Já foram reportados surtos com alimentos de origem animal e outros como alface e *pickles* (FDA, 2012).

*E. coli* (EHEC) tem grande capacidade de virulência e dose infecciosa baixa. Apesar de ocorrer infecções por EHEC em todo o mundo, em países desenvolvidos os casos são pontuais. A sintomatologia clínica inclui diarreia sanguinolenta, falência renal e pode levar à morte (entre 3- 5% dos casos). O serótipo mais comum é *E. coli* O157:H7, que produz verotoxinas do tipo Shiga, sendo também conhecida por *E. coli* STEC. Apesar de este serótipo ser predominante em cerca de 75% das infecções do grupo EHEC (em todo o mundo), outros serótipos como O113 e O91 já foram reportados e também causam doença grave (FDA, 2012). O serótipo *E. coli* O157:H7 é muito encontrado em produtos lácteos e carnes sendo considerado uma zoonose pois o gado bovino é o principal reservatório. No entanto, o consumo de água ou alimentos contaminados com excrementos de animais tem levado ao aumento de infecções devido a ingestão de folhas verdes, vegetais frescos e frutas (Chekabab *et al.*, 2013). Nos EUA, ocorreu um aumento de 11% para 41%, nos casos de infecção devido a *E. coli* O157:H7 proveniente de vegetais e frutas (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009). A alface tem sido um dos vegetais mais reportados em casos de surtos de *E. coli* O157:H7, principalmente nos EUA (FAO/WHO, 2008).

*E. coli* (EIEC) produz enterotoxinas semelhantes a toxinas produzidas pela espécie *Shigella* spp., sendo que ambas têm a capacidade de invadir a mucosa do cólon e multiplicar-se, propagando-se às células adjacentes depois da destruição das células infectadas (Viegas, 2009; FDA, 2012). Casos esporádicos de EIEC são raros nos países desenvolvidos mas assim como EPEC e ETEC, são endémicos em alguns países

em desenvolvimento (Viegas, 2009). Esta bactéria pode ser encontrada em qualquer alimento ou água que estejam contaminados com fezes de pessoas infectadas ou directamente através da transmissão de pessoa a pessoa, sendo o homem o único reservatório da doença (FDA, 2012).

*E. coli* (EAEC) foi descoberto mais recentemente e tem como característica principal a adesão bacteriana às células epiteliais intestinais. Os sintomas podem ser desde diarreias agudas a persistentes (Viegas, 2009). Geralmente os países desenvolvidos apresentam apenas surtos pontuais. É um grupo produtor de verotoxina O104:H4, e tem alta resistência por possuir uma combinação incomum de características típicas de patógenos de *E.coli* enteroagregativa, além da capacidade de produção de toxina Shiga, típica do grupo das EHEC (FDA, 2012). O maior surto deste tipo, a nível mundial, ocorreu em Maio de 2011, aparentemente originado na Alemanha (EFSA, 2013a.) Por ser um serogrupo raro, este surto foi considerado incomum e rapidamente espalhou-se por alguns países da UE e América do Norte, que em muitas vezes evoluía para casos de Síndrome Urémica Hemolítica (HUS). Após investigação epidemiológica o alimento identificado como veiculador do surto foi o rebento de feijão, oriundo do Egipto, e que normalmente é consumido cru em saladas (Balabanova *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014; Yeni *et al.*, 2015). Constatou-se também que este alimento era de origem biológica (King *et al.*, 2012). Ainda não é conhecido o reservatório desta doença (Berger *et al.*, 2010).

*E. coli* (DAEC) tem um padrão de adesão difuso às células do epitélio intestinal, causando diarreias aquosas (sem sangue e leucócitos nas fezes), muito semelhante a causada pelas EPEC, mas mais persistente, normalmente em crianças (Baqui *et al.*, 1992). Os marcadores de virulência da DAEC associados à diarreia também estão por ser esclarecidos e sabe-se pouco sobre este grupo (FDA, 2012).

#### **1.7.1.3. *Listeria monocytogenes***

O género *Listeria* compreende bactérias Gram-positivas com dez espécies conhecidas. *Listeria monocytogenes* é quase exclusivamente a única causadora de infecções em humanos estando presente no solo, nas plantas e na água (Kefalonía & Effímia, 2015). A principal forma de transmissão é através de alimentos contaminados. Sabe-se que os animais domésticos e selvagens infectados também são um importante reservatório de listeriose, podendo também ocorrer transmissão directa de pessoa a pessoa. Os alimentos mais associados também são de origem animal e, com menor proporção, os vegetais crus. É um microorganismo muito resistente à desidratação, ao calor e temperaturas baixas. Consegue multiplicar-se a temperaturas entre 2 a 4°C afectando alimentos prontos a consumir (Viegas, 2009) inclusive vegetais prontos para consumo (Kefalonía & Effímia, 2015).

Apesar do número de infecções provenientes de *Listeria* ser significativamente menor, esta bactéria é uma das principais causas de morte em infecções de origem alimentar em países industrializados. Há dois tipos de manifestação da doença, a gastroenterite, com sintomas passageiros como náusea, febre e diarreia e, em alguns casos, sintomas invasivos e graves, com altos índices de mortalidade devido à ocorrência de septicémia, meningoencefalites e abscessos (FDA, 2012) principalmente em grávidas (podendo ocasionar abortos), crianças, idosos e doentes imunodeprimidos (Viegas, 2009). A dose infecciosa de *L. monocytogenes* pode variar conforme a estirpe bacteriana, o sistema imunitário do hospedeiro e a matriz alimentar envolvida, podendo ser inferior a 1000 células em pessoas susceptíveis (FDA, 2012).

Em Portugal, Mena *et al.* (2004) analisaram diversos produtos quanto à contaminação por *L. monocytogenes*. Este microorganismo foi encontrado em diversas matrizes alimentares como carne bovina crua (17,7%), frango cru (60%), leite cru (16,7%), peixe cru (12%), farinha (18,5%) e vegetais congelados (12,9%).

## **1.8. Detecção de contaminação microbiana em vegetais crus**

As contagens efectuadas para controlo microbiológico de produtos hortícolas crus, geralmente incluem como indicadores hígio-sanitários a avaliação de aeróbios totais a 30°C e *E. coli*. As contagens de microrganismos totais a 30°C têm por objectivo determinar a carga microbiológica aeróbia, mesófila e viável no produto a analisar em que determina-se a presença de bactérias, bolores e leveduras presentes no alimento (Food Standards, 2001).

Já as contagens de *E. coli* servem para análise de contaminação fecal. Uma possível contaminação, indica que o alimento não foi cultivado, transportado, conservado ou preparado em condições de higiene satisfatórias, o que indica uma contaminação indesejável, provavelmente de origem fecal, e um risco da presença de agentes patogénicos intestinais, podendo também ser indicador da presença de *Salmonella* spp. (Krometis *et al.*, 2010). A pesquisa de *Salmonella* em amostras vegetais também é um importante requisito para a avaliação microbiológica dos vegetais e hortaliças, que deve estar ausente em 25g de alimento, caso contrário, este é considerado insatisfatório para consumo (Food Standards, 2001).

## **1.9. Parasitoses intestinais**

As parasitoses intestinais ou enteroparasitoses podem ser causadas por helmintas e/ ou protozoários e são das infecções mais prevalentes nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Haque, 2007). Sabe-se também que um quarto de todas as doenças infecciosas humanas das quais se tem conhecimento, são causadas por parasitas (helmintas/ protozoários) (Cleaveland *et al.*, 2001) sendo responsáveis pelo aumento das taxas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, em especial nas áreas onde são endémicas (Haque, 2007).

As enteroparasitoses, em geral, são transmitidas indirectamente pela via fecal-oral através da ingestão de água e vegetais contaminados com ovos, quistos ou oocistos (Masucci *et al.*, 2011) além disso, são transmitidas directamente pelo contacto mão a mão entre pessoas, revelando que o papel das mãos humanas como denominador comum de transmissão de parasitas intestinais é crucial. As moscas domésticas também são consideradas vectores de alguma importância pois contaminam superfícies e alimentos com quistos de parasitas e ovos de helmintas (Alum *et al.*, 2010). Pode-se dizer que a maioria das parasitoses intestinais reportadas são transmitidas por alimentos contaminados (Masucci *et al.*, 2011) o que é explicado devido ao facto dos protozoários serem comumente encontrados na microflora natural das plantas (Gourabathini *et al.*, 2008).

As infecções parasitárias são responsáveis por algumas deficiências de vitaminas (A, B6, B12) e minerais (ferro, cálcio e magnésio) e em consequência, redução da resposta imunológica o que aumenta a predisposição a doenças mais graves; além disso, muitas das vezes os efeitos de desnutrição só são detectados alguns anos após a infecção, o que mostra a sua cronicidade (Alum *et al.*, 2010). Sabe-se actualmente que o risco de infecções parasitárias não é apenas limitado a regiões tropicais e subtropicais devido às constantes viagens internacionais e ao aumento dos casos de imigrações. Quanto ao ramo alimentar, pode-se dizer que a globalização do fornecimento de alimentos e o aumento do consumo de alimentos crus têm contribuído para o aumento das enteroparasitoses (Orlandi *et al.*, 2002).

### 1.10. Protozooses

Os protozoários são parasitas unicelulares que conseguem multiplicar-se dentro do hospedeiro; são cosmopolitas de elevada prevalência sendo os principais responsáveis por infecções gastrointestinais nos países desenvolvidos (Haque, 2007). A diarreia é a principal manifestação clínica (Motta & Silva, 2002) particularmente em crianças, sendo também um grave problema de saúde pública frequentemente negligenciado (Osman *et al.*, 2016). O risco de infecção parasitária é também mais elevado no caso de indivíduos imunossuprimidos (Fletcher *et al.*, 2012). Os protozoários intestinais podem ser comensais (sem benefícios ou prejuízos para qualquer dos parceiros) ou patogénicos. As espécies patogénicas podem ser invasivas (penetram nos tecidos originando quadros clínicos graves), ou não invasivas, com quadros clínicos mais benignos. Podem ser classificados em: *Sarcodina* (amebas), *Mastigophora* (flagelados), *Ciliophora* (ciliados), *Coccidia* (coccídeas ou esporozoários). As espécies consideradas comensais e que dispensam tratamento são: (1) amebas: *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkoushii*, *Entamoeba gingivalis*, *Entamoeba polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii*; (2) flagelados: *Trichomonas hominis*, *Chilomastix mesnili*, *Embadomonas intestinalis*, *Enteromonas hominis* e *Trichomonas tenax*. Os protozoários intestinais patogénicos estão incluídos nos cinco grupos: (1) amebas: *Entamoeba histolytica*; (2) flagelados: *Giardia lamblia*, *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis*; (3) ciliado: *Balantidium coli*; (4) esporozoários: *Cryptosporidium parvum*, *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayentanensis* e *Sarcocystis* spp. (Stark *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2012; Fletcher *et al.*, 2012, Legua & Seas, 2013).

O tracto intestinal humano pode servir de hospedeiro para os protozoários parasitas veiculados através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, inclusive saladas verdes, além da transmissão de pessoa para pessoa (através da via fecal-oral). *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. têm grande potencial de contaminar água e alimentos, sendo causadores da maioria das DOA por parasitas no mundo, inclusive em países desenvolvidos (Osman *et al.*, 2016).

### 1.10.1. Descrição dos diferentes géneros de protozoários intestinais e respectivos ciclos de vida

#### 1.10.1.1. *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* é um género de protozoário cosmopolita classificado no filo Apicomplexa (seres unicelulares, formadores de esporos) (Jay, 2000). Este parasita é constituído de diferentes espécies e genótipos e tem mais de 150 espécies de hospedeiros mamíferos. Apesar do reconhecimento de diversas espécies do género *Cryptosporidium*, cerca de 90% das infecções reportadas envolvem apenas duas espécies, *C. hominis* (antropo-nótico) e *C. parvum*, uma espécie zoonótica (Iqbal *et al.*, 2015).

A veiculação hídrica é considerada a forma mais importante de transmissão da criptosporidiose. A transmissão zoonótica também tem um papel importante na disseminação desta doença pois esta pode ocorrer devido ao contacto directo com animais infectados ou as fezes destes animais ou indirectamente através da aplicação de adubos de origem animal utilizados como fertilizantes, uma vez que estes podem contaminar a água ou os alimentos (Budu-Amoako *et al.*, 2011). Também pode ocorrer contaminação do alimento devido a manipulação inadequada (em especial, lavagem inadequada das mãos) por parte dos produtores agrícolas ou manipuladores de alimentos, que estejam infectados (Iqbal *et al.*, 2015).

Os oocistos são a forma de transmissão, são esféricos ou ovais e as dimensões variam entre 4-6µm de diâmetro, em função da espécie (Dawson, 2005). Os oocistos esporulados são constituídos de quatro esporozoítos, estes são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados e após ingestão por outros indivíduos os esporozoítos são liberados e fazem aderência às células epiteliais do intestino, tornando-se trofozoítos, que são os responsáveis pela sintomatologia clínica do hospedeiro (Macpherson *et al.*, 2000). Os indivíduos infectados apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, mas a patogenicidade do parasita varia de acordo com a espécie envolvida e de acordo com o estado imunológico do hospedeiro (Xiao *et al.*, 2004). O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. (Figura 1.1) é monoxeno, ou seja, a fase de reprodução (assexuada e sexuada) ocorre em somente um animal.

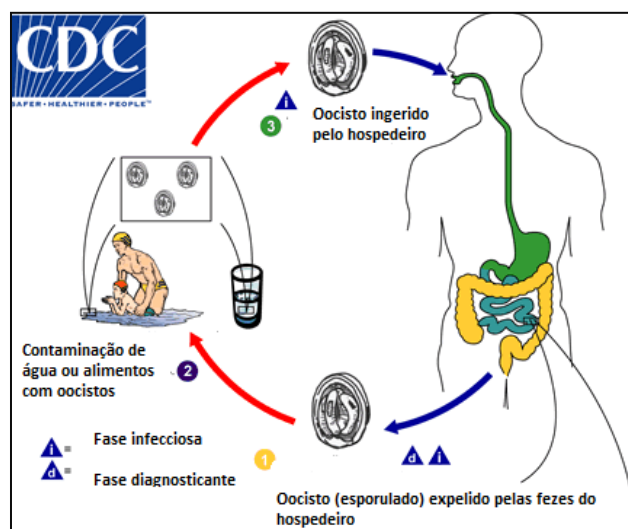


Figura 1.1 - Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. (Adaptado de CDC, 2013a)

Na Europa, a presença de surtos sazonais de criptosporidiose em pessoas, ocorre principalmente nos meses de Agosto e Setembro (ECDC, 2013). Em 2013 foi reportado na Suécia um surto com forte evidência devido a ingestão de salada contaminada por *Cryptosporidium* spp. e dois surtos de origem alimentar com evidência fraca reportados na Alemanha e Irlanda. Foram detectados também três surtos com forte evidência devido a água contaminada: dois na Irlanda (*Cryptosporidium parvum*) e um no Reino Unido (*Cryptosporidium hominis*) (EFSA & ECDC, 2015a). Em 2014 foi reportado um surto com forte evidência na Suécia por *Cryptosporidium parvum* devido ao consumo de salsa contaminada e também quatro surtos com evidência fraca envolvendo diversos alimentos. Na Alemanha também foram reportados dois surtos semelhantes (EFSA & ECDC, 2015b).

Em Portugal, o primeiro surto de criptosporidiose foi descrito em 1987 e afectou 27% das crianças e uma educadora do infantário do Hospital de Santa Maria, em Lisboa, contudo, a origem do surto não foi identificada (Melo Cristino *et al.*, 1988). Verificou-se também que os bivalves presentes nas bacias do rio Tejo e Guadiana, podem ser um possível veículo de infecção humana, devido a presença de moluscos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* nas águas destes rios (Melo *et al.*, 2006). Até a data não foram reportados surtos de veiculação hídrica por contaminação de *Cryptosporidium* em Portugal (Almeida *et al.*, 2010).

#### **1.10.1.2. *Giardia***

Os protozoários pertencentes ao género *Giardia*, apesar de eucariotas, não têm algumas estruturas típicas como as mitocôndrias e as peroxissomas (Adam, 2001). São também binucleados e flagelados (Birky, 2005). A partir de estudos moleculares, permitiu-se descobrir que apesar da semelhança morfológica, podem ser encontrados sete genótipos a partir de isolados de *Giardia duodenalis* sendo estes A, B, C, D, E, F e G (Anexo II) (Monis *et al.*, 2003). Os genótipos A e B são causadores de infecção em humanos e em muitos outros mamíferos (Caccio & Ryan, 2008) e são potencialmente zoonóticos (Sprong *et al.*, 2009). Sabe-se que de todas as espécies encontradas, *Giardia duodenalis* tem uma ampla gama de espécies hospedeiras. Esta espécie tem também como sinónimo os nomes *G. intestinalis* e *G. lamblia*, sendo os três nomes aceites na literatura (Feng & Xiao, 2011). No entanto, segundo o Código Internacional da Nomenclatura Zoológica, o nome *G. duodenalis* tem prioridade (Monis *et al.*, 2009).

A transmissão da giardiose pode ser de pessoa para pessoa (através da via fecal-oral) ou indirecta, através de água e/ou alimentos contaminados, sendo mais comum em locais de poucas condições sanitárias (Prasad, 2013). Os trofozoítos raramente são libertados para o meio ambiente não sendo infecciosos devido a pouca resistência ao meio. Os quistos de *Giardia duodenalis* contêm quatro núcleos e podem ter de 7 a 10µm de diâmetro; são ovais e cobertos por uma parede fina que pode ter 0,3 a 0,5µm de espessura (Adam, 2001). São muito resistentes as condições ambientais e podem permanecer viáveis por vários meses (Duffy *et al.*, 2013). O ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (Figura 1.2) é monoxénico. Nos casos sintomáticos da infecção, a diarreia é um importante sinal clínico (Feng & Xiao, 2011) no entanto, a maioria dos casos são assintomáticos (Prasad, 2013).

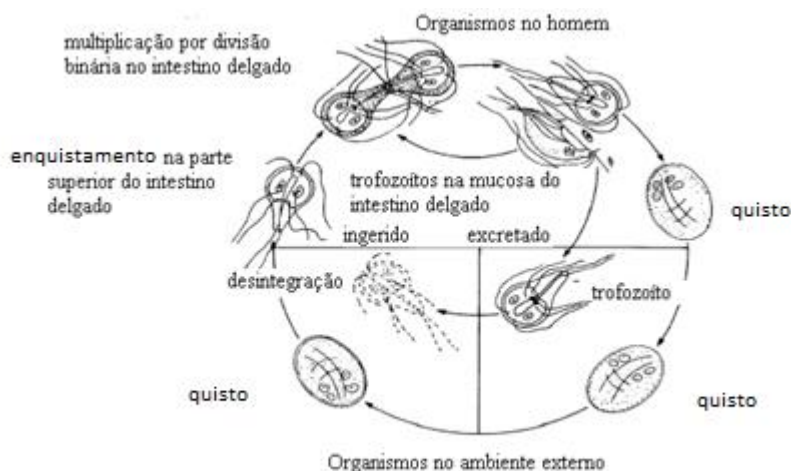


Figura 1.2- Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. (Adaptado de Smith *et al.*, 2007)

A giardiose tem maior prevalência nos países em desenvolvimento, no entanto, é a parasitose intestinal mais frequente nos países desenvolvidos com prevalência entre 2 a 5% (Oberhuber *et al.*, 1997) sendo atribuída à presença de imigrantes e pessoas que viajam em locais onde a giardiose é endêmica (Ekdahl & Andersson, 2005), no entanto, a transmissão pode ser autóctone (Espelage *et al.*, 2010).

Em 2013 foram reportados doze surtos de origem alimentar na UE (evidência fraca) por *Giardia* spp. (sete surtos na Alemanha, dois na Irlanda, dois na Polónia, um em Latvia) (EFSA & ECDC, 2015a). Já em 2014, seis surtos de origem alimentar (evidência fraca) foram causados por *Giardia* spp. (EFSA & ECDC, 2015b). Do que se sabe, nunca foram detectados surtos de giardiose em Portugal devido a água contaminada (Almeida *et al.*, 2010). No entanto, concentrações significativas de *Giardia duodenalis* foram encontradas em amostras de água recolhidas dos rios da região sul de Portugal (Alves *et al.*, 2006). Em um estudo feito por Júlio *et al.* (2012) foi observada uma prevalência de 82% de amostras de água provenientes de praias fluviais no sul de Portugal positivas para *Giardia* e *Cryptosporidium*.

### 1.10.1.3. *Entamoeba*

*Entamoeba* é um género de protozoários amebóides anaeróbios que podem ser parasitas ou comensais no intestino de diferentes vertebrados e invertebrados (Shiratori & Ishida, 2016). Apresentam uma morfologia característica, com a presença de pseudópodes que possibilitam movimentos citoplasmáticos para a locomoção e a ingestão de alimentos através de fagocitose. Os pseudópodes têm formato cilíndrico e são denominados lobopódios (Smirnov & Brown, 2004). Os principais tipos de protozoários amebóides são: (1) amebas: sem nenhuma estrutura protectora da membrana plasmática (onde estão incluídos os géneros *Entamoeba*, *Amoeba* e *Acanthamoeba*); (2) foraminíferos: a membrana plasmática está encerrada em uma teca ou concha e (3) actinópodes: que têm pseudópodes designados por axopódios ou actinopódios; estes são longos e rectos (Vaerewijck *et al.*, 2014).

Todas as espécies do género *Entamoeba* têm um ciclo de vida simples constituído por quistos, que são as formas infecciosas e de resistência ambiental bem como os trofozoítos (ameba) que são as formas

móveis. Já foram observadas sete espécies do género *Entamoeba*; destas seis estão presentes no tracto intestinal dos humanos e são agrupadas de acordo com o número de núcleos presentes nos quistos maduros, podendo estes ter um, quatro ou até oito núcleos (Zeibig, 2014).

Pode-se dizer que apenas *Entamoeba histolytica* é considerada patogénica pois do que sabe, é a única espécie a fagocitar eritrócitos humanos e que necessita de medicação adequada para tratamento. A transmissão ocorre por meio da ingestão dos quistos excretados pelas fezes de pessoas contaminadas (via fecal-oral); estes podem contaminar a água e alimentos (Schuster & Visvesvara, 2004). Este parasita é causador de amebíase, também chamada de disenteria amebiana, que ocorre devido a invasão e lesão da mucosa intestinal (Serrano-Luna *et al.*, 2013). A prevalência de *Entamoeba histolytica* é mundial, sendo maior em regiões tropicais e subtropicais (Schuster & Visvesvara, 2004). Os quistos são esféricos e medem entre 12 a 15µm, contém de um a quatro núcleos e ocasionalmente é possível observar corpos cromatóides em forma de bastonetes. Devido a grande semelhança morfológica com a espécie *Entamoeba dispar*, que não é patogénica, é aconselhada a realização de testes moleculares para um diagnóstico mais fiável. Os trofozoítos medem geralmente de 20 a 40µm, com apenas um núcleo (McHardy *et al.*, 2014).

*Entamoeba coli* é considerada uma espécie comensal e cosmopolita; o ciclo de vida é semelhante a outras espécies. Os trofozoítos são maiores que *Entamoeba histolytica* podendo chegar a medir até 55µm de diâmetro. As estruturas nucleares são realçadas quando os trofozoítos estão corados, se não estiverem realçados por coloração, a cromatina periférica e o cariossomo aparecem como estruturas refringentes. O núcleo consiste de um cariossomo grande e circundado por cromatina periférica, que torna-se evidente após coloração. A coloração com lugol é de grande auxílio para a análise morfológica dos quistos (sendo estes significativamente maiores que das outras espécies), com média de 15-25µm de diâmetro, são esféricos, com parede celular espessa e contêm de um a oito núcleos com cariossomos excêntricos (Zeibig, 2014). A amebíase é uma doença pouco frequente em Portugal, mas que não pode ser negligenciada, principalmente se houver ingestão de alimentos e/ou água contaminados com quistos amebianos (Pinheiro *et al.*, 2009).



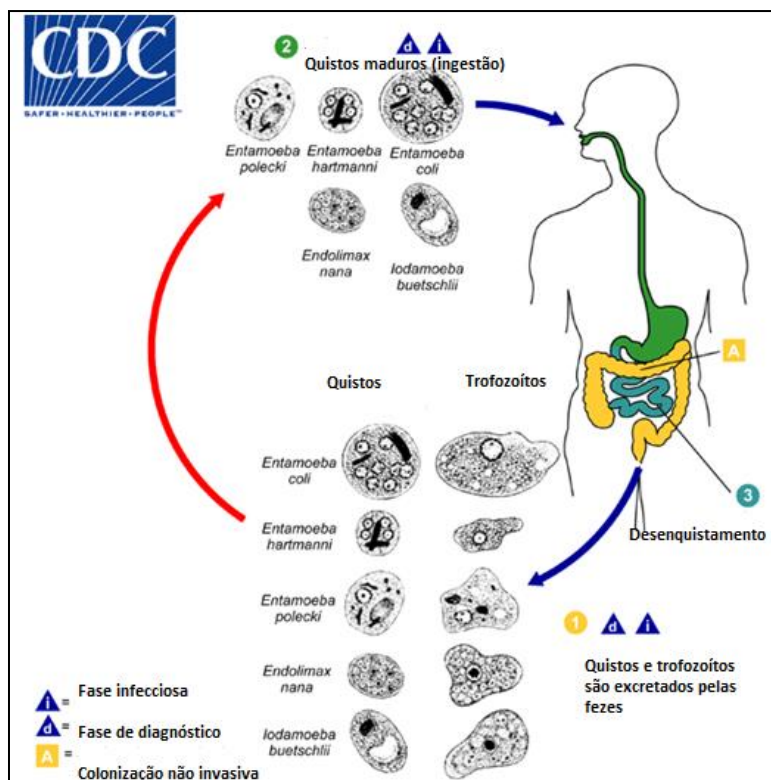


Figura 1.3- Quistos e trofozoítos de diferentes espécies de amebas. (Adaptado de CDC, 2013b)

#### 1.10.1.4. Cyclospora

*Cyclospora* também é, assim como *Cryptosporidium*, uma coccídea intracelular obrigatória, pertencente ao filo Apicomplexa, causador da ciclosporiase em várias espécies de mamíferos e répteis (Verweij & Stensvold, 2014). No entanto, só foi considerado um parasita de maior importância a partir de 1990, época em que foram reportados alguns surtos de doenças gastrointestinais relacionados com alimentos de produção agrícola, i.e. frutas de casca macia e vegetais folhosos. Este protozoário também é reportado em surtos devido à contaminação de água, mas em menor frequência que *Cryptosporidium* e *Giardia* (Dawson, 2005). *Cyclospora cayetanensis* tem distribuição mundial e parece ser a única espécie que infecta apenas humanos, não havendo evidências de transmissão zoonótica. O ciclo de vida (Figura 1.4) é monoxeno e a infecção ocorre através da ingestão de oocistos esporulados, estes medem cerca de 8 a 10µm e são excretados pelas fezes. Podem necessitar de mais de uma semana para ocorrer esporulação ambiental (Verweij & Stensvold, 2014) o que não acontece com *Cryptosporidium*, com isso, a transmissão de pessoa a pessoa é improvável.

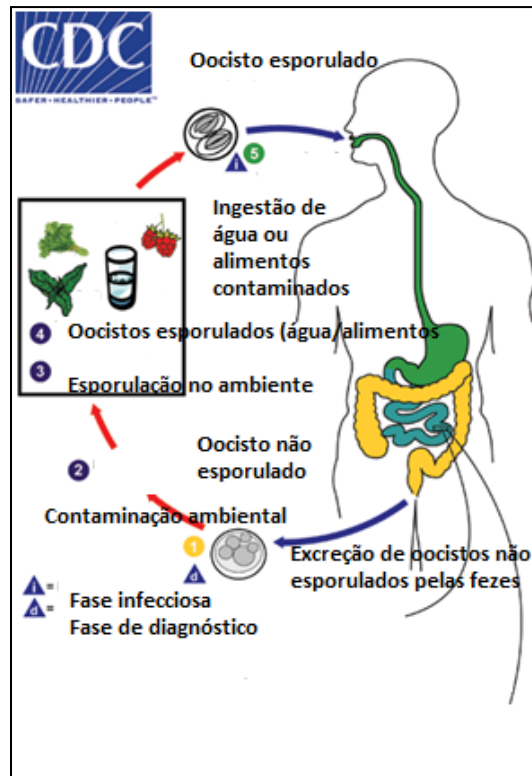


Figura 1.4- Ciclo de vida de *Cyclospora cayentanensis*. (Adaptado de CDC, 2015)

Dos oocistos libertam-se os esporozoítos, que conseguem colonizar os enterócitos do intestino delgado e provocam sintomas semelhantes aos da criptosporidiose (Jay, 2000) sendo a diarreia aquosa o principal sintoma, no entanto, há também indivíduos assintomáticos para esta infecção (Harris *et al.*, 2003). Crianças originárias de áreas endémicas são mais susceptíveis, já nos países desenvolvidos, apesar de menor prevalência, são reportados surtos que afectam principalmente os adultos e os imunossuprimidos (Legua & Seas, 2013).

A contaminação fecal da água do solo é provavelmente a forma mais comum de transmissão, pois permite a ingestão directa de oocistos através da água, ou indirectamente quando esta é usada na rega das plantações (Dawson, 2005) podendo também ocorrer contaminação do solo. As frutas e vegetais são dos alimentos mais problemáticos pois os resíduos usados para fertilização ou a água de rega contaminados com oocistos permitem que estes permaneçam no ambiente por vários dias até a esporulação (Sherchand *et al.*, 2007). Já foram reportados surtos de ciclosporidiose pontuais devido ao consumo de framboesas, alfaces, manjeriço e salada em alguns países como Alemanha, EUA e Canadá. Não há registos de surtos de ciclosporíase em Portugal (FAO/WHO, 2008).

#### 1.10.1.5. *Balantidium*

*Balantidium coli* é a única espécie de protozoário ciliado (filo Ciliophora) capaz de infectar humanos sendo também considerado o maior protozoário capaz de infectar humanos e outros primatas. É cosmopolita e pode parasitar o intestino grosso do porco, hospedeiro primário que na maioria das vezes não manifesta a doença. Quanto aos humanos, este parasita também apresenta baixo potencial patogénico, só em casos mais raros (indivíduos desnutridos, imunossuprimidos ou alcoólicos) pode ocorrer disenteria (com muco e sangue) semelhante aos sintomas causados por *Entamoeba histolytica*, no entanto, são raros os casos fatais (Schuster & Ramirez-Avila, 2008). Já foram descritas cerca de 50 espécies encontradas em variados hospedeiros como rato, cão, gatos, bem como peixes, aves, anfíbios e até artrópodes (i.e. barata) (Verweij & Stensvold, 2014). A espécie encontrada no porco é *Balantidium suis*, morfológicamente semelhante a *B. coli* reportada em humanos (Schuster & Ramirez-Avila, 2008).

Este parasita tem um ciclo de vida simples, com as fases de quisto infeccioso e trofozoíto, a fase móvel. Depois de ingeridos, os quistos dão origem aos trofozoítos que migram para o cólon alimentando-se de bactérias e de detritos presentes no intestino, no entanto, também libertam enzimas que aderem a mucosa intestinal podendo originar úlceras na parede do cólon e causar diarreias. Os quistos de *B. coli* têm menor resistência a condições ambientais adversas do que quistos de outros parasitas (Shuster & Visvesvara, 2004). O diagnóstico microscópico é relativamente fácil pois os trofozoítos e quistos têm uma morfologia muito distinta. Os trofozoítos são ciliados e pode-se observar no interior um macronúcleo em forma de rim e em alguns casos pode-se observar também o cistostoma (ou sulco oral) por onde o parasita alimenta-se. O tamanho dos trofozoítos pode variar de 50 a 100µm de comprimento (McHardy *et al.*, 2014) podendo em alguns casos chegar a 200µm de comprimento (Verweij & Stensvold, 2014) e de 40 a 70µm de largura. Os quistos são arredondados mas também apresentam o macronúcleo visível, têm uma parede espessa com cílios, que nem sempre são visíveis e têm de 50 a 70µm de comprimento e 40 a 60µm de largura (McHardy *et al.*, 2014).

A balantidiose ou balantidiase pode ser adquirida por humanos através do contacto directo (fecal-oral) com intestinos ou fezes de porco, sendo considerada uma zoonose (Schuster & Ramirez-Avila, 2008). Neste caso, pratos mal cozinhados que utilizem intestinos de porcos são uma fonte de contaminação importante, podendo também ocorrer transmissão de pessoa para pessoa, em especial nos locais com maior aglomeração de pessoas, como orfanatos, prisões e asilos (Shuster & Visvesvara, 2004). Na maioria dos casos, a transmissão é veiculada por água ou alimentos contaminados com quistos do parasita (Schuster & Ramirez-Avila, 2008) fazendo do homem e de outros mamíferos, hospedeiros acidentais. Apesar de mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais, a balantidiase pode ocorrer esporadicamente em países não endémicos como nos EUA, Japão, Austrália e Europa Ocidental (Shuster & Visvesvara, 2004), Suécia, Finlândia e Norte da Rússia (Solaymani-Mohammadi & Petri Jr, 2006). Estudos feitos na Alemanha e no Japão reportaram índices elevados de contaminação de porcos por *B. coli* (Shuster & Visvesvara, 2004). Esta espécie já foi encontrada em alguns tipos de alimentos como morangos (Silva *et al.*, 2014), couves e repolhos (Nyarango *et al.*, 2008). De maneira geral, pode-se dizer que esta infeccção é relativamente rara, um dos poucos surtos reportados ocorreu nas Ilhas Carolinas (um

arquipélago localizado a nordeste da Nova Guiné) devido a ingestão de água contaminada (Schuster & Ramirez-Avila, 2008).

## 1.11. Protozoários de vida livre

### 1.11.1. *Amoeba*

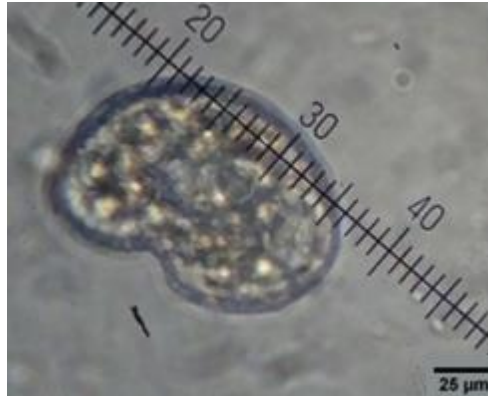
É um protozoário amebóide, que não apresenta estrutura protectora da membrana plasmática e utiliza pseudópodes para locomoção e alimentação. É um organismo de vida livre comum em água doce e que em condições adversas tem a capacidade de sofrer enquistamento. Há várias espécies diferentes, a maioria alimenta-se de bactérias, são organismos relativamente simples, que mudam constantemente de forma devido aos pseudópodes, o tamanho pode variar muito conforme a espécie podendo chegar a medir 500µm (Patterson, 1996; Araújo & Medeiros, 2014).



Figura 1.5- Trofozoíto de *Amoeba* spp. encontrado em agrião de origem biológica. (Original)

### 1.11.2. *Colpoda*

É um ciliado com distribuição mundial, já foi reportado em matrizes alimentares como o espinafre. Há várias espécies, sendo a espécie *Colpoda steinii* a mais comum. Este protozoário também tem a capacidade de sofrer enquistamento em situações desfavoráveis, os trofozoítos são as formas móveis ciliadas que alimentam-se de bactérias e detritos, pode atingir em média 50µm (Gourabathini *et al.*, 2008; Vaerewijck *et al.*, 2010).



**Figura 1.6-** Trofozoíto de *Colpoda* spp. encontrado em alface de origem biológica. (Original)

### 1.11.3. *Paramecium*

Pertence a classe dos Oligohymenophorea, que são protozoários que apresentam sulco ventral contendo a boca e cílios orais distintos, separados do corpo. Há várias espécies encontradas, sendo dos protozoários de vida livre mais conhecidos, além de ser facilmente observável a presença de cílios, poder, em seu interior, grandes e pequenos vacúolos. Possui movimento relativamente rápido e tem grandes dimensões, em média pode chegar a 80μm de comprimento, dependendo da espécie (Patterson, 1996; Araújo & Medeiros, 2014).



**Figura 1.7-** *Paramecium* spp. em microscopia de contraste de fase. (Patterson, 1996).

## 1.12. Rotíferos

São microorganismos aquáticos que alimentam-se de bactérias e detritos do meio. A classe Bdelloidea é a mais comum, com mais de 1000 espécies diferentes e com reprodução através de partenogênese, não ocorrendo meiose. Podem ter de 100 a 1000μm de comprimento e apresentam em sua constituição músculos, gânglios, órgãos sensoriais tácteis e fotossensíveis, órgãos digestivos secretores e ovários.

Movimentam-se por rastejamento, pelo batimento ciliar da corona ou saltando pela água a partir de apêndices especializados (Welch & Meselson, 2001).



Figura 1.8- Rotífero encontrado em agrião de origem biológica. (Original)

### 1.13. Protozoários de vida livre como potenciais vectores de bactérias patogénicas

Os protozoários de vida livre são organismos encontrados em uma variedade de ambientes, inclusive em alimentos, como vegetais (Gourabathini *et al.*, 2008; Vaerewijck *et al.*, 2011), frigoríficos domésticos (Vaerewijck *et al.*, 2010) e panos de cozinha (Chavatte *et al.*, 2014). Estes organismos têm uma grande capacidade de predação de bactérias (Pernthaler, 2005), no entanto, há bactérias que conseguem sobreviver mesmo após serem fagocitadas por trofozoítos de protozoários de vida livre, podendo inclusive multiplicar-se dentro deles (Vaerewijck *et al.*, 2014), e muitas delas são patogénicas como *Campylobacter jejuni* (Axelsson-Olsson *et al.*, 2005; Baré *et al.*, 2010), *Escherichia coli* O157:H7 (Barker *et al.*, 1999), *Listeria monocytogenes* (Zhou *et al.*, 2007), *Salmonella* spp. (Gaze *et al.*, 2003; Tezcan-Merdol *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (Huws *et al.*, 2008), *Arcobacter butzleri* (Medina *et al.*, 2014) e *Yersinia enterocolitica* (Lambrecht *et al.*, 2013).

Além disso, algumas bactérias podem sobreviver dentro de quistos de protozoários de vida livre e, após o estabelecimento de condições favoráveis, sofrem desenquistamento e libertam-se, permitindo a colonização de novos habitats (Lambrecht *et al.*, 2015). Também os insectos, rotíferos e nemátodes de vida livre podem actuar como vectores no transporte de bactérias patogénicas para os alimentos (Ortega & Sanchez, 2010) e no transporte de oocistos de protozoários patogénicos, como *Cryptosporidium* spp. sendo este fenómeno já reportado em diversos estudos (Fayer *et al.*, 2000; Stott *et al.*, 2003; Huamanchay *et al.*, 2004; Szostakowska *et al.*, 2004).

## 1.14. Helminthoses

Os helmintos são organismos multicelulares que podem ser divididos em nemátodes, céstodes e tremátodes (Haque, 2007) sendo o homem, hospedeiro definitivo de várias espécies de helmintos. As enteroparasitoses causadas por helmintos transmitidos através de solo contaminado, também conhecidos por geohelmintos, estão entre as mais comuns do mundo, afectando principalmente as regiões mais pobres do globo. As quatro principais espécies de geohelmintos são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e duas espécies de ancilostomídeos: *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* (WHO, 2016).

As crianças representam o grupo com mais prevalência e intensidade de infecção por geohelmintos (WHO, 2016). A transmissão pode ocorrer pela via fecal-oral (ingestão de ovos eliminados pelas fezes) como nos casos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, penetração activa de larvas através da pele do hospedeiro humano (ancilostomídeos e strongilídeos) ou transmissão de larvas para o hospedeiro através de picada de artrópodes vectores, como é o caso da filariose. Algumas helmintoses podem causar diarreias e outros problemas gastrointestinais, no entanto, geralmente a sintomatologia não é muito específica (Ortega *et al.*, 2010) mas em casos de infecção intestinal severa (com invasão da mucosa intestinal) a diarreia pode ser um sintoma comum (Motta & Silva, 2002).

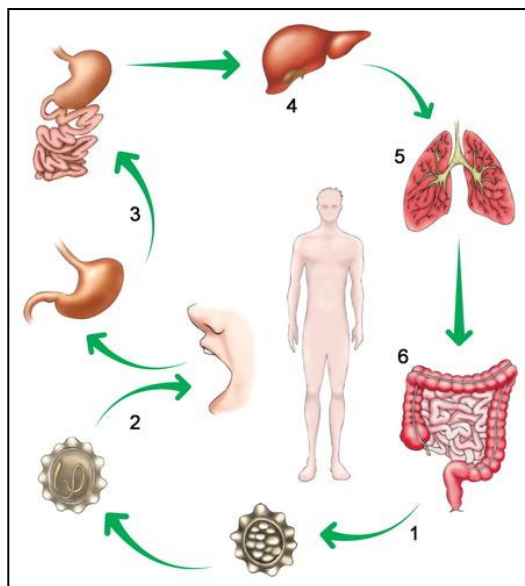
### 1.14.1. Descrição dos principais géneros de helmintos intestinais e respectivos ciclos de vida

#### 1.14.1.1. Nemátodes: *Ascaris*

Este é um género de nemátode que parasita o intestino de vários mamíferos. A espécie *Ascaris lumbricoides* é causadora da ascaridíase em humanos, sendo o nemátode mais comum e o maior de todos eles. Pode ser encontrado em todo o mundo, mas é muito comum em regiões tropicais visto que, a temperatura e humidade favorecem o desenvolvimento dos ovos no solo (Ryan & Ray, 2004).

A transmissão desta parasitose é pela via fecal-oral. Apesar da possibilidade de ovos de *Ascaris* spp. serem encontrados em vegetais frescos, inclusive em países industrializados, não é muito comum a existência de surtos, embora casos individuais possam ocorrer (Northrop-clews & Shaw, 2000). Este parasita não é invasivo e por isso, na maioria das vezes os casos são assintomáticos, contudo, nos casos de alta carga parasitária é possível a ocorrência de obstrução intestinal, especialmente em crianças (Ryan & Ray, 2004).

Estudos de risco feitos no México, Egipto, Chile, Israel e Alemanha sugerem que a utilização de água residual não tratada na rega de vegetais demonstrou ser um factor significativo para o aumento do número de casos de infecção por helmintos como *Ascaris lumbricoides* (Blumenthal & Peasey, 2002). O ciclo de vida deste parasita pode ser observado na Figura 1.9.



**Figura 1.9- Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*.**(Adaptado de Ortega *et al.*, 2010)

(1) Inicialmente ocorre a eliminação dos ovos pelas fezes, depois de embrionados tornam-se infecciosos; (2) Ocorre a ingestão de ovos embrionados, que atingem o duodeno (3) As larvas eclodem no duodeno e depois migram para a corrente sanguínea e finalmente para o fígado; (4) Podem depois entrar nos vasos sanguíneos novamente e passar pelo coração e para os pulmões; (5) No pulmão, as larvas invadem os alvéolos e sobem pelos brônquios chegando por à faringe onde são na maioria das vezes deglutidas, até atingirem novamente o intestino delgado; (6) Por fim, sofrem maturação.

#### **1.14.1.2. *Trichuris***

*Trichuris trichiura* é a espécie de nemátode que parasita o intestino grosso dos humanos, sendo mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais. O modo de transmissão é idêntico ao de *Ascaris lumbricoides* (via fecal-oral) por meio da ingestão de alimentos crus, mal lavados ou água contaminada. Depois de eliminados pelas fezes, os ovos podem levar de 15 a 30 dias até o desenvolvimento da larva no seu interior. Depois de ingeridos, os ovos atingem o intestino delgado, local onde saem as larvas que migram para o ceco e para a mucosa intestinal onde sofrem maturação. A sintomatologia também depende da carga parasitária, em casos mais graves pode ocorrer prolapso rectal e disenterias severas com dano na mucosa intestinal (FAO/WHO, 2014).

Estudos de risco feitos no Egito e Japão também sugerem que a utilização de água residual não tratada na rega de vegetais possibilitou o aumento do número de casos de infecção por *Trichuris trichiura* (Blumenthal & Peasey, 2002). Amoah *et al.* (2006) também reportaram a presença ovos de vários helmintes, inclusive de *Trichuris trichiura* em amostras de alface e repolho produzidas por pequenos agricultores de África (Gana) que utilizavam águas residuais para a irrigação destes alimentos. A contaminação destes alimentos também foi atribuída à aplicação de estrume de origem animal e ao solo contaminado.



#### 1.14.1.3. Céstodes: *Taenia*

*Taenia* é um género de céstode do filo dos Platelminas, que são parasitas de diversos vertebrados, inclusive o homem. As espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata* parasitam o intestino delgado do homem, que é o HD. Ambas as espécies têm distribuição cosmopolita e apresentam a morfologia e o ciclo de vida muito similares, no entanto, *T. solium* tem menor prevalência (Northrop-clews & Shaw, 2000).

*Taenia solium* pode também causar no homem uma doença grave, a cisticercose. Esta ocorre pela ingestão de ovos do parasita que irá provocar o desenvolvimento de cisticercos, estes também sofrerão desenvolvimento nos tecidos, em especial no sistema nervoso central (neurocisticercose), sendo esta a manifestação clínica mais importante em humanos podendo causar epilepsia e morte. A contaminação pode ocorrer devido a ingestão de água ou alimentos contaminados com ovos de *T. solium*, inclusive os vegetais, fazendo com que o homem seja acidentalmente tomado como hospedeiro intermediário. Os ovos eclodem no intestino e as oncosferas invadem a mucosa intestinal, alcançam a corrente circulatória sanguínea e migram especialmente para os músculos, onde enquistam, mas algumas podem enquistar-se nos olhos, no cérebro e no coração (Sorvillo *et al.*, 2007).

#### 1.14.1.4. Tremátodes: *Fasciola*

As duas espécies causadoras de fasciolíase hepática em humanos são *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (Orlandi *et al.*, 2002); são ambos tremátodes pertencentes ao filo dos Platelminas. A espécie *F. hepatica* tem origem europeia sendo também a mais comum, distribui-se em todo o mundo, especialmente na Europa, nas Américas e Oceania, já a espécie *F. gigantica* tem uma distribuição mais reduzida, ocorrendo em África e Ásia (Mas-Coma *et al.*, 2005). Os vermes adultos são achatados e podem alcançar de 2 a 5cm de comprimento (Macpherson *et al.*, 2000) e como a maioria dos tremátodes é hermafrodita. No total há seis espécies de tremátodes que podem ser transmitidos por meio de ingestão de plantas aquáticas (i.e. agrião) e que causam doença em humanos. *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* são parasitas hepáticos, enquanto que as outras 4 espécies: *Fasciolopsis buski*, *Gastrodiscoides hominis*, *Watsonius watsoni* e *Fischoederius elongatus* são parasitas intestinais. A fasciolose é uma doença que afecta especialmente o fígado de animais herbívoros e omnívoros (que são os HD, reservatórios da doença) como boi, ovelha, cabra e porco podendo causar lesões hepáticas, fibrose e inflamação dos canais biliares (Mas-Coma *et al.*, 2005).

O ciclo de vida deste parasita é heteroxeno. O ser humano é infectado apenas ocasionalmente pela ingestão de plantas aquáticas com metacercárias enquistadas (Calretas & Carvalho, 2003), com cargas parasitárias usualmente menores. Depois de algumas semanas, as metacercárias sofrem maturação e produzem ovos, que são expelidos com as fezes do hospedeiro para completar o ciclo de vida do parasita. Se atingirem a água, irão eclodir dos ovos os mirácidos, que são larvas ciliadas que penetram nos tecidos de certas espécies de gastrópodes de água doce, estes são hospedeiros intermediários onde ocorre a reprodução assexuada (esporocisto- rédias- cercárias). As cercárias são larvas caudadas que abandonam o gastrópode e nadam até o solo ou superfície da água, perdem a cauda e acabam enquistando-se (metacercária) sobre folhas de plantas aquáticas, especialmente o agrião. Além do agrião, a alface, os

rabanetes (Northrop-clewes & Shaw, 2000) e os espinafres (Tezer *et al.*, 2013) crus, ou mal cozinhados são susceptíveis à contaminação por metacercárias. Depois de ingeridas, elas perfuram na mucosa intestinal até atingir o fígado (canais biliares) o que provoca necrose e reacções inflamatórias (Northrop-clewes & Shaw, 2000). As metacercárias também podem ser ingeridas devido a ingestão de água contaminada (Tezer *et al.*, 2013). *F. hepatica* infecta os gastrópodes da espécie *Galba truncatula*, que também têm origem europeia (Mas-Coma *et al.*, 2005).

A fasciolose já foi reportada em Portugal e em diversos países como: Espanha, França, Alemanha, Grã-Bretanha, Áustria, Noruega, Bolívia, Irão, Peru, EUA, China e Turquia (Tezer *et al.*, 2013). Como o parasita não sobrevive durante a cozedura, uma profilaxia importante é comer agrião cozinhado, pois este é o principal veículo da fasciola hepática (Viegas, 2009).

### 1.15. Detecção de parasitas em vegetais

Apesar da ocorrência de vários estudos descritos para avaliar a contaminação de alimentos de origem vegetal por protozoários e helmintes, não há nenhum método padronizado que permita o isolamento e detecção destas estruturas em alimentos. A metodologia dos trabalhos publicados inclui de maneira geral três etapas básicas: lavagem do vegetal para a extracção das formas parasitárias (ovos, larvas, quistos e oocistos), concentração das formas parasitárias por meio de sedimentação e/ou centrifugação e identificação do material recuperado sob microscopia óptica, a partir da análise de lâminas feitas com o material concentrado, fazendo-se também colorações específicas.

O líquido de lavagem do alimento, para a extração das estruturas parasitárias, pode variar bastante, desde água destilada (Nyarango *et al.*, 2008; Arbos *et al.*, 2010), solução fisiológica (0,95% NaCl) (Al-Megrin, 2010), entre outros. De maneira geral, o objectivo é o desprendimento das estruturas parasitárias dos alimentos. Para a concentração das estruturas parasitárias, muitos dos estudos utilizam metodologias que, em geral, são adaptadas de métodos coprológicos, como por exemplo, a técnica de sedimentação espontânea ou Método de Hoffmann (Hoffmann *et al.*, 1934) em que o material é suspenso em água e deixado em repouso (geralmente por 24 horas) permitindo a concentração das estruturas parasitárias no fundo do cálice de sedimentação. O líquido sobrenadante é desprezado e parte do sedimento é observado em microscópio. É uma técnica de baixo custo e de fácil execução e por isso tem sido muito utilizada na pesquisa de parasitas em vegetais (Falavigna *et al.*, 2005). Este método é muito utilizado para a pesquisa de ovos pesados, como os de tremátodes e céstodes (Quadros *et al.*, 2008), contudo, alguns trabalhos obtiveram maior eficácia a partir do uso desta técnica para a detecção de ovos, larvas de helmintes e quistos de protozoários (Montanher *et al.*, 2007; Barnabé *et al.*, 2010).

No caso das técnicas de centrifugação, muitos dos trabalhos utilizam o método de sedimentação por centrifugação (Método de Blagg, também chamado de Método de Ritchie) e o Método de Faust que é um método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) a 33%, densidade de 1,18 g/ml. É preparada uma solução hipersaturada com 330 g de ZnSO<sub>4</sub> para 1 litro de água destilada (Faust *et al.*, 1938) sendo uma técnica de escolha na detecção de estruturas leves, como os ovos, quistos e oocistos de protozoários (Quadros *et al.*, 2008) podendo também ser usada na detecção de ovos pesados (Carleton & Tolbert, 2004). Ambos os métodos são de fácil execução mas requerem o uso de centrífuga. Alguns trabalhos

utilizam na metodologia, técnicas de sedimentação espontânea e posterior execução de técnicas de centrifugação (Takayanagui *et al.*, 2007).

As técnicas baseadas na microscopia convencional baseiam-se na identificação de estruturas por meio da morfologia e confirmação por medição com ocular micrométrica; são de baixo custo e fácil execução e por isso, são muito utilizadas. Muitos estudos fazem uso da solução de lugol para evidenciar quistos de protozoários em observações em directo (França *et al.*, 2009; Sangaré *et al.*, 2015). Além do esfregaço directo, as técnicas de coloração são muito usuais, sendo a coloração Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen & Pohlenz, 1981) a mais empregada na detecção de coccídeas, em especial para espécies do género *Cryptosporidium*, que têm oocistos de tamanho reduzido. Estes são observados em microscópio óptico e medidos com auxílio de uma ocular micrométrica, apresentam formato esférico com cerca de 4 a 6µm de diâmetro e uma tonalidade rosa avermelhada brilhante e com granulações (que podem ou não serem vistas em todos os oocistos) num fundo esverdeado que favorece o contraste (Rigo & Franco, 2002; McHardy *et al.*, 2014). Esta coloração também pode ser utilizada para a detecção de oocistos de outras coccídeas como *Cystoisospora belli* e *Cyclospora cayentanensis*, sendo estes de dimensões visivelmente maiores que os oocistos de *Cryptosporidium* (Legua & Seas, 2013; Sangaré *et al.*, 2015). A principal limitação desta técnica é a variável sensibilidade, que pode ser muito reduzida em amostras com poucos oocistos (Iqbal *et al.*, 2015). No caso de *Giardia*, a coloração por Giemsa é muito usada para facilitar a identificação de quistos e trofozoítos (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

Outro método usado para a detecção de oocistos e quistos em matrizes alimentares é a partir da microscopia de imunofluorescência, com o uso de *kits* específicos, alguns detectam simultaneamente *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. sendo considerada, por alguns autores, a técnica mais indicada para pesquisa destes dois tipos de parasitas. A imunofluorescência directa (IFD) é um método imunoenzimático que se baseia na ligação dos anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína às proteínas de superfície da parede dos oocistos e dos quistos, que são visualizados pela emissão de fluorescência (Júlio, 2012). É uma técnica de elevada especificidade e sensibilidade (McHardy *et al.*, 2014). Contudo, para alguns autores (Pereira da Fonseca, 2000), esta técnica não revelou maior sensibilidade que a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada. As principais desvantagens são a necessidade de técnicos especializados (Legua & Seas, 2013), além do elevado preço dos *kits* comercializados e a necessidade obrigatória de um microscópio de fluorescência (McHardy *et al.*, 2014).

As técnicas moleculares permitem a amplificação do ácido desoxirribonucleico (ADN) por meio de técnicas como a de PCR, e têm como grande vantagem a identificação da espécie ou genótipo do parasita. Esta é uma técnica rápida, com elevada especificidade e altamente sensível (Tangtrongsup & Scorza, 2010). No entanto, uma grande dificuldade do uso de PCR em matrizes alimentares é que muitos alimentos têm em sua constituição, substâncias como polissacáridos, pectina, polifenóis, fenóis, entre outros, que são conhecidos por inibirem reacções de PCR (Ganz *et al.*, 2015), sendo que os vegetais, frutas e marisco são alguns exemplos importantes (Schrader *et al.*, 2012).

Em 2016, foi proposta a ISO 18744:2016, que especifica um método para a detecção e quantificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em vegetais folhosos e bagas frescas (Robertson *et al.*, 2016). Este método de padronização utiliza a técnica da separação imunomagnética (IMS) para a separação dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* a partir da especificidade dos anticorpos, com o uso de *kits*

apropriados e do uso de esferas magnéticas e um sistema magnético. As esferas encontram-se revestidas com anticorpos monoclonais que se ligam à parede externa dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium*, formando um complexo esfera-anticorpo-quisto/oocisto. Depois do isolamento dos oocistos ou quistos, estes permanecem em suspensão e é feita a coloração com anticorpos monoclonais e a observação em microscopia de epifluorescência (Júlio, 2012).

## 1.16. Objectivos

O principal objectivo deste estudo é determinar os níveis de contaminação microbiológica e parasitológica em vegetais comercializados na área metropolitana de Lisboa, como é o caso do agrião, da alface, da couve-galega, do cebolinho e do espinafre provenientes dos sistemas de cultivo biológico e convencional.

Este estudo também tem como objectivos:

- i) Detectar e identificar, sempre que possível ao nível da espécie, protozoários e helmintes (inclusive ovos, quistos e oocistos) presentes nas hortaliças provenientes dos dois tipos de cultivo;
- ii) Determinar a frequência dos diferentes parasitas identificados e relacionar com possível patogenicidade;
- iii) Avaliar a qualidade microbiológica destes alimentos, através da enumeração de coliformes termotolerantes (NMP/g) e presença de *Escherichia coli*;
- iv) Determinar a influência de diversos factores como a variedade de hortaliça, tipo de cultivo e proveniência das amostras na prevalência de coliformes termotolerantes, *E. coli* e parasitas;
- v) Contribuir para o conhecimento das condições hígio-sanitárias de hortaliças disponibilizadas na área metropolitana de Lisboa e o seu possível impacto na Saúde Pública.

## 2. Material e Métodos

Entre os meses de Outubro de 2015 a Março de 2016, foram recolhidas 100 amostras de hortaliças, 50 provenientes de agricultura biológica e 50 de agricultura convencional. A amostragem foi feita aleatoriamente com 10 unidades de cada uma das 5 variedades de hortaliça (agrião, alface, couve-galega, espinafre e cebolinho). As amostras foram adquiridas em 13 Mercados (5 de Produtos Biológicos e 8 Mercados Municipais), 1 Mercaria de Produtos Biológicos e 2 Feiras Municipais em diferentes localidades da Área Metropolitana de Lisboa (Figura 2.1). Em todos os casos, foi mantido o anonimato dos vendedores de alimentos.



Figura 2.1- Mapa com descrição da localidade dos mercados amostrados. (Original).

### 2.1. Obtenção das amostras - caracterização dos mercados em estudo

#### 2.1.1. Agricultura biológica

Foram analisadas 50 amostras provenientes de cinco mercados biológicos e uma mercearia de

produtos biológicos (todos os estabelecimentos amostrados tinham certificação de origem biológica). Os mercados têm funcionamento apenas aos Sábados, enquanto a mercearia funciona de Segunda a Sábado, no horário de 9h30 e 20h30, respectivamente.

### **2.1.2. Agricultura convencional**

As 50 amostras de agricultura convencional foram provenientes de oito mercados municipais (regulamentados pela Câmara Municipal de Lisboa), com horários de funcionamento de Segunda a Sábado. As duas feiras municipais, também regulamentados pela CML, dispõem de uma grande variedade de produtos, inclusive alguns de origem não alimentar e decorrem semanalmente, com uma grande afluência de pessoas.

## **2.2. Recolha e acondicionamento das amostras**

Durante a recolha, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos individuais, fornecidos pelo próprio comerciante e depois transportadas a temperaturas inferiores a 10°C e analisadas num período máximo de 24 horas depois de adquiridas. Cada uma das amostras foi encaminhada para os laboratórios de Microbiologia Alimentar e de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV/ULisboa) e analisadas quanto aos critérios microbiológicos e parasitológicos, sendo também identificadas de acordo com a variedade de vegetal, o tipo de cultivo (biológico ou convencional), a proveniência e a data.

## **2.3. Processamento das amostras**

### **2.3.1. Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Alimentar, da FMV-ULisboa onde se procedeu à quantificação de coliformes termotolerantes e a avaliação da presença de *Escherichia coli* através do teste do indol.

### **2.3.2. Detecção de coliformes termotolerantes**

Para a determinação da presença de coliformes termotolerantes foi utilizada a Técnica do Número Mais Provável (NMP) ou técnica dos tubos múltiplos, segundo o método padronizado pela American Public Health Association (1992) que serve para estimar a densidade de microorganismos viáveis em amostras de alimentos, água ou solo. Com o uso de pinças esterilizadas e segundo padrões de assepsia, cada amostra foi acondicionada em um saco para alimentos esterilizado sendo feita a pesagem de 10g de amostra. Em seguida, adicionou-se o volume de 90mL de água peptonada tamponada (APT) (Biokar Diagnostics, BK018HA) e procedeu-se a homogeneização do material em um homogeneizador durante cerca de 2 minutos. Para cada amostra foram utilizados nove tubos de ensaio com caldo verde brilhante lactose bÍlis 2% (CVBLB) (Oxoid, CM0031), sendo três tubos com CVBLB de concentração dupla (ou seja, com duas

vezes a quantidade indicada na embalagem para a mesma quantidade de água) e 6 tubos com CVBLB de concentração simples (de acordo com a quantidade indicada na embalagem), em todos os tubos de ensaio foram adicionados tubos Durham invertidos que possibilitam a acumulação de gás produzido pelos coliformes permitindo assim a detecção da sua presença na amostra. Cada um dos tubos foi identificado consoante a quantidade de amostra que iria receber e em condições de assepsia, foram inoculados 10mL da amostra em cada um dos 3 tubos contendo 9mL de CVBLB de concentração dupla, 1mL da amostra em cada um 3 tubos contendo 9mL de CVBLB de concentração simples e 0,1mL da amostra nos restantes 3 tubos contendo 9mL de CVBLB de concentração simples. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 44,5°C durante 24-48 horas. A leitura dos tubos é feita após 24-48 horas sendo considerados positivos todos os tubos com formação de gás e/ou turvação devido a fermentação da lactose a 44,5°C.

### **2.3.3. Enumeração de coliformes termotolerantes**

A partir da leitura dos tubos, são utilizados os resultados para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes por grama de alimento, a partir de comparação dos algarismos com uma tabela específica, segundo United States Department of Agriculture (2014) (Anexo III).

### **2.3.4. Detecção de *Escherichia coli* através do Teste do Indol**

O teste do indol é um teste adicional que permite a confirmação da presença de *E. coli* na amostra, e foi feito com o reagente de Kovacs. O meio CVBLB detecta bactérias do grupo coliforme através da produção de gás e o teste do indol é realizado para determinação da presença ou ausência de *E. coli* na amostra. Para tal, em condições de assepsia é feita a transferência de 0,1mL de meio de cada tubo positivo de CVBLB para novos tubos contendo 3mL de água peptonada (Biokar Diagnostics, BK084). Este procedimento é feito para todos os tubos positivos, sendo em seguida incubados em estufa a 44,5°C durante 24 horas. Posteriormente, adiciona-se cerca de 2 gotas do reagente de Kovacs em cada um dos tubos (Merck, 109293). Uma reacção positiva (formação de um anel com coloração cor-de-rosa) mostra a presença de *E. coli*, enquanto que uma reacção negativa (formação de um anel da cor do meio) mostra que *E. coli* não faz parte da população de coliformes fecais presentes na amostra.

## **2.4. Análises parasitológicas**

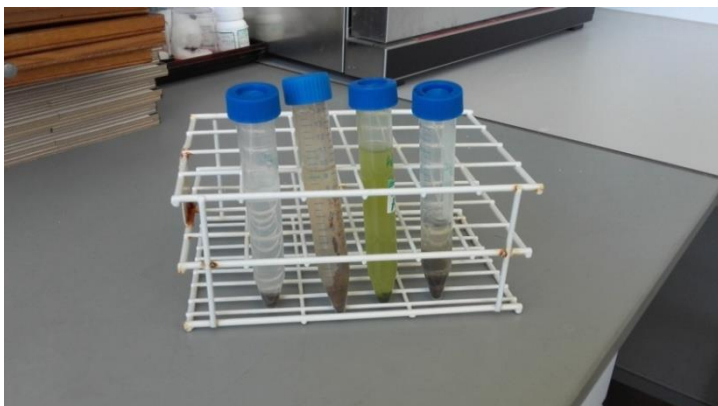
As análises parasitológicas foram efectuadas no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV/ULisboa através da análise microscópica do sedimento recolhido de cada amostra, sendo este obtido por meio da técnica de Sedimentação Espontânea. No entanto, em 17 amostras, da qual a presença de detritos era muito abundante e dificultava a identificação das estruturas, procedeu-se ao Método de Faust, que por sua vez, permitiu melhor visualização devido às várias etapas de centrifugação do material.

Em todas amostras, a partir do sedimento obtido foi feita a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen modificado para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Recorreu-se também à coloração pelo método de Giemsa para evidenciar possíveis quistos de *Giardia* e para melhor visualização de outras estruturas parasitárias como *Entamoeba* spp. e *Balantidium* spp. Em 20 amostras realizou-se a técnica de

Imunofluorescência Directa (IFD) com o uso do *kit* comercial Crypto/Giardia Cel® (Cellabs®) que utiliza anticorpos monoclonais para a detecção simultânea de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

#### 2.4.1. Técnica de Sedimentação Espontânea

Cerca de 50 gramas de cada vegetal analisado foi cortado com uma tesoura e colocado em um copo cónico com 500mL de água da torneira e 2 gotas de detergente neutro e deixado para sedimentação por 24 horas. Após este período, todo o material foi filtrado através de uma compressa de gaze de algodão não estéril (10x10cm) (ADA swabs®), sendo que o material vegetal ficou retido na gaze e suspenso na parte superior do copo devido ao uso de prendedores e uma vareta onde permaneceu em repouso por mais 24 horas. Após este período foi retirada a gaze e o líquido sobrenadante foi desprezado e com uma pipeta de Pasteur foi transferido todo o sedimento restante e guardado em um tubo graduado de 15mL que foi devidamente identificado com o nome da amostra e data da colheita.



**Figura 2.2- Tubos graduados com sedimento obtido das amostras.** (Original).

Com uma pipeta de Pasteur, foram retiradas cerca de 6 gotas do sedimento (0,3mL) para observação em microscopia óptica, entre lâmina e lamela e em duplicado, sendo a primeira observação feita directamente do material (sem adição de corantes) e a segunda com adição de uma gota de lugol (Merck KGaA® 100567). Foi feita a identificação e quantificação de todas as estruturas encontradas. Todos os tubos, assim que utilizados, foram mantidos em refrigeração no frigorífico do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias para posterior realização da técnica de IFD.

#### 2.4.2. Método de Faust

Em algumas das amostras, mesmo após a filtração do sedimento pela gaze de algodão, a presença excessiva de detritos muitas vezes inviabilizava a visualização microscópica do sedimento. Com isso, nestes casos, além da observação em directo utilizou-se o Método de Faust adaptado do protocolo utilizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa (Anexo IV), que consiste na centrifugação-flutuação em solução de sulfato de zinco a 33% (VWR Chemicals Prolabo®).



Inicialmente foi preparada a solução de ZnSO<sub>4</sub> com 33 gramas de produto para cada 100mL de água destilada, a solução foi agitada manualmente até a dissolução completa. Procedeu-se às centrifugações do sedimento com água destilada e posteriormente com a solução de ZnSO<sub>4</sub>. Finalmente, a película superficial do sobrenadante é analisada microscopicamente entre lâmina e lamela e com uma gota de lugol. Os sedimentos resultantes deste método foram descartados depois de analisados, pois o sulfato de zinco pode deformar os quistos e os ovos, o que implica análise imediata do material após execução desta técnica. Foram também centrifugados apenas dois tubos de cada vez para evitar a deformação das estruturas parasitárias.

#### 2.4.3. Preparação e fixação dos esfregaços para coloração Ziehl- Neelsen

A partir dos sedimentos armazenados, foi também realizado um esfregaço por amostra para detecção de *Cryptosporidium* spp. Com uma pipeta de Pasteur foram retiradas cerca de 6 gotas (0,3mL) de sedimento que foi distribuído ao longo de uma lâmina de bordos biselados (76x26 mm) (Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG). Antes da realização do esfregaço, todas as lâminas foram identificadas com o nome da amostra e data da realização do esfregaço.



Figura 2.3 – Esfregaço antes da coloração de Ziehl-Neelsen. (Original)

Após a secagem do esfregaço ao ar, que corresponde à primeira fase de fixação, procedeu-se à coloração do mesmo utilizando a técnica de Ziehl-Neelsen modificada (adaptado de Casemore, 1991) e conforme o protocolo utilizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV/ULisboa (Anexo V), que consiste em submeter o esfregaço a metanol, responsável pela segunda fixação, cobrindo depois o esfregaço com fucsina (Merck KGaA 109215), seguido de lavagem com água e descoloração com álcool clorídrico a 1%, repete-se depois a lavagem com água, e executa-se a coloração com verde malaquite a 0,4% (que é um corante de contraste ao corante fucsina, permitindo melhor visualização das estruturas) e passagem por água corrente. Depois de secos, os esfregaços foram visualizados em microscópio na objectiva de imersão x1000. Consideraram-se como oocistos de *Cryptosporidium* spp. todas as estruturas esféricas ou subesféricas de cor rosa brilhante e com granulações no interior e com dimensões que variam em média de 4-6µm.

#### 2.4.4. Preparação e fixação dos esfregaços para coloração de Giemsa

Para a confirmação de algumas estruturas encontradas na observação microscópica no exame do sedimento, foi realizada a coloração Giemsa. Com uma pipeta de Pasteur foram retiradas cerca de 6 gotas (0,3mL) de sedimento que foi distribuído ao longo de uma lâmina de bordo biselado (76x26 mm) (Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG). Antes da realização do esfregaço, todas as lâminas foram identificadas com o nome da amostra e data da realização do esfregaço.

Após a secagem do esfregaço ao ar, que corresponde à primeira fixação, procedeu-se à coloração Giemsa adaptada a partir do protocolo usado para esfregaços sanguíneos no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa (Anexo VI), que consiste em submeter o esfregaço à acção do metanol, responsável pela segunda fixação, e ao corante Giemsa (Merck KGaA 109204). Depois de secos, os esfregaços foram visualizados em microscópio óptico na objectiva de imersão x1000.

#### 2.4.5. Pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Directa (IFD)

De um total de 100 amostras, 20 foram analisadas para a técnica de IFD com o uso do teste comercial Crypto/Giardia Cel® (Cellabs®). Segundo as informações do fabricante, este é um teste *in vitro* que detecta simultaneamente oocistos de *Cryptosporidium* spp. e quistos de *Giardia* spp. em amostras fecais e ambientais, por meio de anticorpos monoclonais. O reagente de anticorpo monoclonal de ratinho marcado com fluoresceína liga-se, especificamente, aos oocistos e/ou quistos presentes na amostra. A identificação é feita pela cor verde fluorescente e também pela diferença morfológica entre os dois géneros; os oocistos de *Cryptosporidium* spp. medem 4-6µm e têm forma redonda ou oval, já os quistos de *Giardia* spp. medem 8-12µm e apresentam forma elíptica.

Este *kit* é composto pelo reagente Crypto/Giardia Cel (RR2) que contém o anticorpo monoclonal marcado, pela lâmina de controlo positivo para uma utilização (CONTROL+) e pelo meio de montagem (RMG) (Figura 2.4).



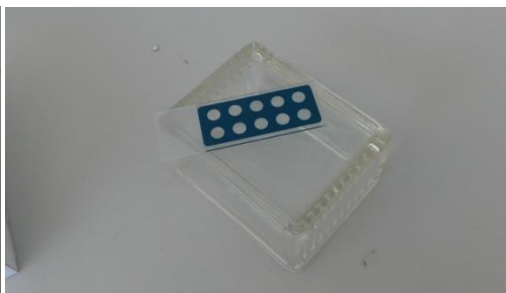
Figura 2.4- *Kit* comercial Crypto/Giardia Cel®. (Original)

Todos estes materiais estão prontos a usar e devem ser conservados entre 2 e 8°C. Para além deste *kit*, foram utilizadas lâminas para microscópio de imunofluorescência Argene® (BioMérieux®); cada uma delas com 10 poços de 6mm de diâmetro (Figuras 2.5 A e B).

A)



B)



**Figura 2.5- Lâminas para imunofluorescência Argene® (a) e lâmina com poços (b). (Original)**

A observação de, no mínimo, um oocisto e/ou quisto pode validar a positividade do teste e deve ser feita com comparação da lâmina de controlo positivo. A sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade deste *kit* são próximas de 100% sendo que, de acordo com as instruções do fabricante, este não apresenta reacções cruzadas com larvas de *Strongyloides stercoralis*, ovos de *Enterobius vermicularis*, *Opisthorchis viverrini*, ancilostomatídeos, *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana*, quistos de *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Entamoeba hartmanni*, *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas hominis*, *Cystoisospora belli*, *Microsporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Listeria* sp., *Legionella* sp., *Erysipelothrix* sp., *Escherichia* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Brochothrix* sp. e *Corynebacterium* sp.

Primeiramente, as lâminas para imunofluorescência foram devidamente identificadas e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções de uso, fornecidas pelo fabricante:

1º) Procedeu-se ao preenchimento de cada um dos poços com 20µl de sedimento, sendo repetido este processo para cada amostra analisada, trocando de ponteira entre cada uma;

2º) Depois das lâminas completamente secas (cerca de 24 horas) foi feita fixação do material com 1 gota de acetona em cada poço e deixou-se secar por 5 minutos;

3º) O reagente RR2 foi levado rapidamente ao vórtex e em seguida foram adicionados 25µl em cada poço, inclusive na lâmina de controlo positivo;

4º) As lâminas foram incubadas a 37°C em câmara húmida por 30 minutos, sendo que, a manutenção da humidade foi importante para evitar que as lâminas secassem, o que poderia causar ligações não-específicas;

5º) As lâminas foram retiradas da câmara e foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) durante um minuto, secando depois em torno dos poços com papel absorvente;

6º) Foi adicionada uma gota de RMG a cada poço e em seguida cobriu-se com lamela (24x50mm) evitando a formação de bolhas de ar. Foi feita de imediato a observação de todas as lâminas com recurso ao microscópio de fluorescência num comprimento de onda de 450 nm, com ampliação de 400x.

## 2.5. Identificação dos géneros parasitários

No que respeita à identificação de todas as estruturas parasitárias encontradas, esta foi feita com o microscópio óptico binocular Olympus BX51. A pesquisa foi feita nas ampliações de  $\times 100$  e  $\times 400$  e alguns dos géneros parasitários, foram identificados de acordo com (CDC, 2016) e (Patterson, 1996) e sempre que necessário foram registados fotograficamente, com câmara digital (Sony Cyber-Shot) e com o uso de ocular micrométrica. No caso dos esfregaços, estes foram observados em microscópio óptico binocular Olympus BX40 na ampliação  $\times 1000$  (em imersão).

## 2.6. Análise estatística

A análise estatística envolveu medidas de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, médias e respectivos desvios-padrão) e estatística inferencial. O nível de significância para aceitar ou rejeitar a hipótese nula foi fixado em  $(\alpha) \leq 0,05$ . Utilizou-se o teste t de Student quando se comparou dois grupos em variáveis dependentes de tipo quantitativo. O pressuposto de normalidade de distribuição foi analisado com o teste de Kolmogorov-Smirnov e o de homogeneidade de variâncias com o teste de Levene. Utilizou-se também o teste Binomial, quando se comparou duas amostras com proporções independentes, o teste do Qui-quadrado de independência e o teste de Fisher. O pressuposto do Qui-quadrado de que não deve haver mais do que 20,0% das células com frequências esperadas inferiores a 5 foi analisado. Nas situações em que este pressuposto não estava satisfeito usou-se o teste do Qui-quadrado por simulação de Monte Carlo. As diferenças foram analisadas com o apoio dos resíduos ajustados estandardizados. A análise estatística foi efectuada com o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 24.0 para Windows.

Foram analisadas as variáveis:

- i) Local de proveniência: Mercado Biológico, Mercado Convencional, Feira Municipal ou Mercaria de produtos biológicos;
- ii) Tipos de cultivo: biológico ou convencional;
- iii) Variedade de vegetal;
- iv) Positividade para *E. coli*: as amostras foram avaliadas de acordo com os resultados obtidos no teste do indol.

### 3. Resultados

#### 3.1. Proveniência dos vegetais amostrados

Dos 100 vegetais amostrados, 82% (82/100) correspondem a amostras recolhidas em mercados, tanto biológicos quanto convencionais, sendo 45% (45/100) correspondentes a amostras adquiridas em Mercados Biológicos e 37% (37/100) em Mercados Convencionais. As restantes amostras 18% (18/100) foram adquiridas em Feiras Convencionais (13%) e numa Merceria Biológica (5%) (Figura 3.1).

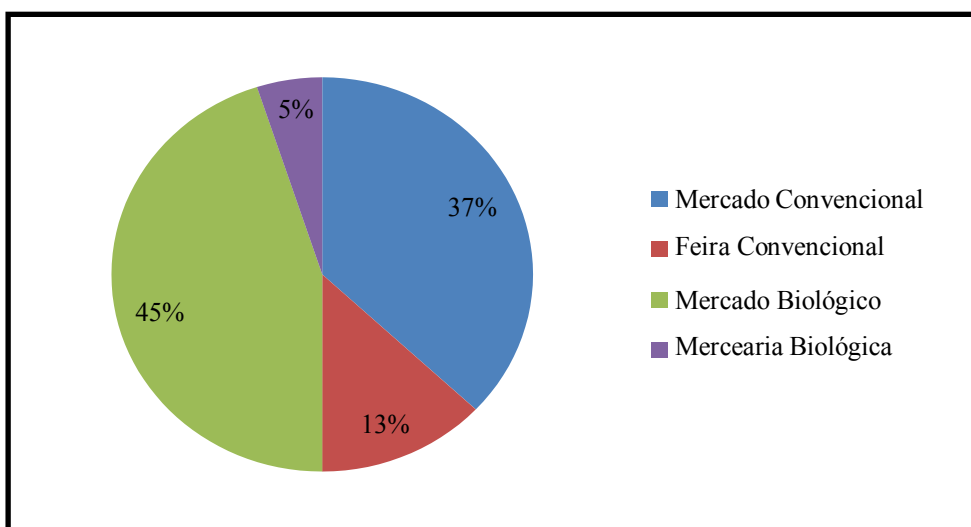


Figura 3.1 – Percentagem de vegetais amostrados consoante a proveniência ( $n=100$ ).

#### 3.2. Resultados das análises microbiológicas

##### 3.2.1. Resultados da contagem de coliformes termotolerantes

A leitura dos tubos deve classificar cada um como positivo ou negativo para a presença de coliformes termotolerantes. A avaliação deve incluir a presença de gás e/ou de turvação do meio conforme a Figura 3.2.



**Figura 3.2- Prova confirmatória de coliformes termotolerantes pelo NMP.** (Arbos *et al.*, 2010).

A interpretação dos resultados deve ser feita classificando como positivos, todos os tubos com presença de turvação (B) ou presença de turvação e gás no tubo de Durham (C). Caso não ocorra alteração na cor do meio e não exista a presença de gás, o resultado é negativo (A).

Os resultados da contagem de coliformes termotolerantes a 44,5°C foram analisados a partir da tabela do NMP que fornece valores entre  $< 3$  a  $> 1,1 \times 10^3$  NMP/g (Anexo III). Os valores de coliformes termotolerantes encontrados em cada amostra, bem como os resultados do teste do indol encontram-se no Anexo VII (para os vegetais de origem convencional) e Anexo VIII (para os de origem biológica). A média de contagens de coliformes termotolerantes nos vegetais de origem biológica foi de  $2,26 \times 10^2$  NMP/g, enquanto que a média de contagens de coliformes termotolerantes nos vegetais de origem convencional apresentou o valor de  $4,34 \times 10^2$  NMP/g. Pode-se observar que o grupo convencional apresenta valores de coliformes termotolerantes significativamente mais elevados que o grupo biológico (434,33 vs 226,34),  $t(95,274) = 2,501$ ,  $p = 0,014$  (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1 – Média e Desvio Padrão dos valores de coliformes termotolerantes ( $n=50$ ).**

	Convencional		Biológico		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	t
	434,33	449,59	226,34	379,0	2.501*

\*  $p \leq 0,05$

Dos 100 vegetais avaliados para a pesquisa de coliformes termotolerantes, 21% (21/100) apresentaram valores  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g. Quanto ao grupo biológico, observou-se que 14% (7/50) apresentaram contagens de coliformes termotolerantes com valores  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g e 28% (14/50) das amostras de origem convencional, sendo que estes valores são superiores ao limiar do método de detecção utilizado neste trabalho (Tabela 3.2 A e B).

Tabela 3.2- Frequência de amostras em relação a valores de coliformes termotolerantes  $\geq 1,10 \times 10^3$  NMP/g. a) Origem biológica ( $n=50$ ); b) Origem convencional ( $n=50$ ).

A)

Coliformes termotolerantes ( $\geq 1,1 \times 10^3$ NMP/g) Origem biológica	Frequência	Percentagem
Negativo	43	86%
Positivo	7	14%
Total	50	100%

B)

Coliformes termotolerantes ( $\geq 1,1 \times 10^3$ NMP/g) Origem convencional	Frequência	Percentagem
Negativo	36	72%
Positivo	14	28%
Total	50	100%

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os dois tipos de cultivo relativamente à contagem de coliformes termotolerantes  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g ( $p=0,140$ ). Pode-se observar que das amostras de origem biológica com contagens de coliformes termotolerantes  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g, 4 amostras são de cebolinho, 1 de couve e 2 de espinafre (Figura 3.3).

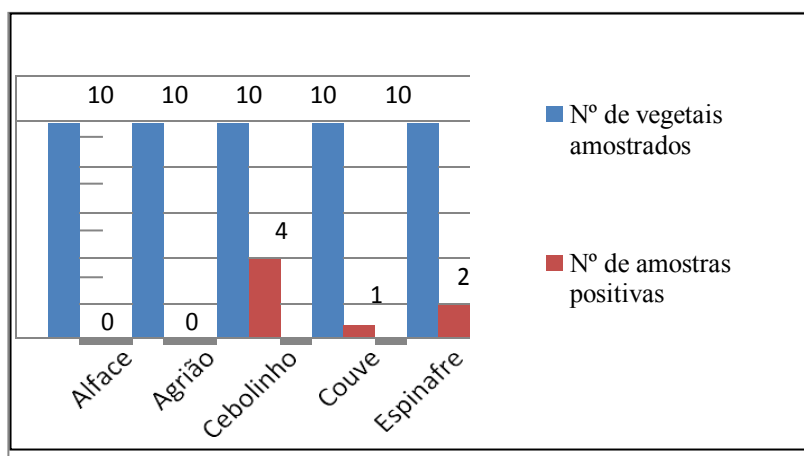
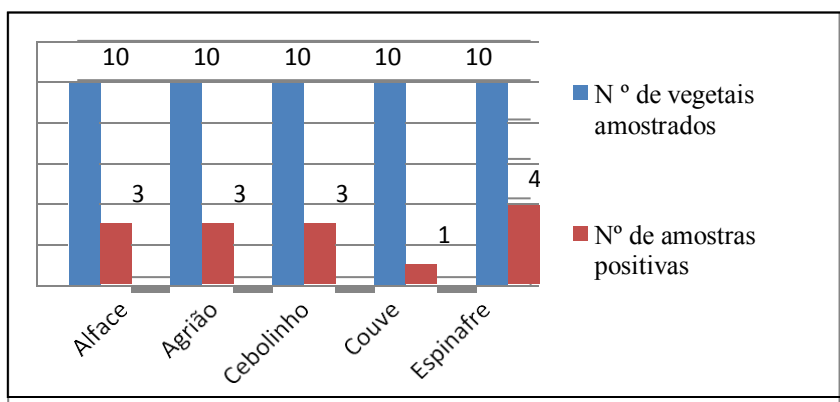


Figura 3.3 - Relação entre o número de amostragem e de amostras positivas para coliformes com contagens elevadas em vegetais biológicos ( $n=50$ ).

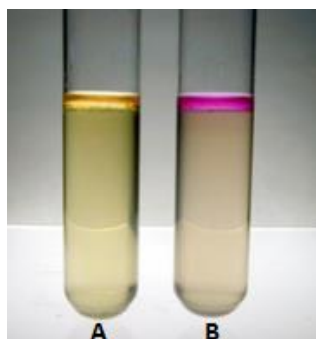
Das amostras de origem convencional com contagens de coliformes termotolerantes  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g, 4 amostras são de espinafre, 3 amostras de cebolinho, 3 de agrião, 3 de alface e 1 amostra de couve (Figura 3.4). Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre a variedade dos vegetais amostrados e a presença de contagens elevadas de coliformes termotolerantes  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3.4- Relação entre o número de amostragem e de amostras positivas para coliformes com contagens elevadas em vegetais convencionais ( $n=50$ ).**

### 3.2.2. Resultados do teste do indol

A interpretação dos resultados considera um resultado indol positivo, quando após a adição do reagente de Kovacs, surge uma coloração rosa avermelhada na superfície do meio, indicando a presença de *E. coli* na amostra (Figura 3.5).



**Figura 3.5- Resultados do teste do indol.** (Arbos *et al.*, 2010)

A) Resultado indol negativo (presença de anel com a mesma coloração do meio); (B) Resultado indol positivo (presença de anel com coloração rosa avermelhada).

Foi observada contaminação por *E. coli* em 56% das amostras (56/100). Destas, 34% são de origem biológica (17/50) e 78% (39/50) são de origem convencional. Quando se comparou a positividade de amostras biológicas e convencionais quanto à presença de *E. coli*, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ). Os resultados do teste do indol encontram-se resumidos na Tabela 3.3 A e B.



Tabela 3.3- Resultados do teste do indol. a) Origem biológica (n=50); b) Origem convencional (n= 50).

A)

Resutados teste do indol- origem biológica	Frequência	Percentagem
Negativo	33	66%
Positivo	17	34%
Total	50	100%

B)

Resutados teste do indol- origem convencional	Frequência	Percentagem
Negativo	11	22%
Positivo	39	78%
Total	50	100%

Das 7 amostras de origem biológica com valores  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g de coliformes termotolerantes, 4 foram positivas para a presença de *E. coli* (Anexo VIII). Contudo, todas as 14 amostras de origem convencional com valores  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP/g de coliformes termotolerantes estavam contaminadas com *E. coli* sendo a diferença estatisticamente significativa, teste de Fisher,  $p = 0,022$ . Foi avaliada a frequência de *E. coli* de acordo com as variedades de vegetais, para os dois tipos de cultivo. Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Frequência de *E. coli* entre as variedades de vegetais. (n=50).

	Convencional		Biológico	
	N	%	N	%
Alface	9	90%	4	40%
Agrião	8	80%	4	40%
Couve	5	50%	2	20%
Cebolinho	8	80%	6	60%
Espinafre	9	90%	1	10%

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de contaminação fecal e a proveniência das amostras, para os dois tipos de cultivo. No biológico, encontramos o Mercado 1 com uma proporção de amostras contaminadas com *E. coli* significativamente mais elevada do que o esperado (64,0%),  $\chi^2 (5) = 20.370$ ,  $p = 0,001$  (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5– Frequência de *E. coli* de acordo com a proveniência. Origem biológica (n=50).**

		<i>E. coli</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Mercado1	Freq.	9	16	25
	%	36.0%	64.0%	100.0%
Mercado 2	Freq.	8	1	9
	%	88.9%	11.1%	100.0%
Mercado 3	Freq.	4	0	4
	%	100.0%	0.0%	100.0%
Mercado 4	Freq.	3	0	3
	%	100.0%	0.0%	100.0%
Mercado 5	Freq.	4	0	4
	%	100.0%	0.0%	100.0%
Mercearia 6	Freq.	5	0	5
	%	100.0%	0.0%	100.0%
Total	Freq.	33	17	50
	%	66.0%	34.0%	100.0%

No convencional, encontramos os Mercados 8 e 9 com proporções de amostras contaminadas com *E. coli* significativamente mais baixas do que o esperado (0,0% e 40,0%),  $\chi^2(9) = 21.348$ ,  $p = 0,007$  (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6 – Frequência de *E. coli* de acordo com a proveniência. Origem convencional (n=50).**

		<i>E.coli</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Mercado 7	Freq	0	5	5
	%	0.0%	100.0%	100.0%
Mercado 8	Freq	3	0	3
	%	100.0%	0.0%	100.0%
Mercado 9	Freq	3	2	5
	%	60.0%	40.0%	100.0%
Mercado 10	Freq	1	4	5
	%	20.0%	80.0%	100.0%

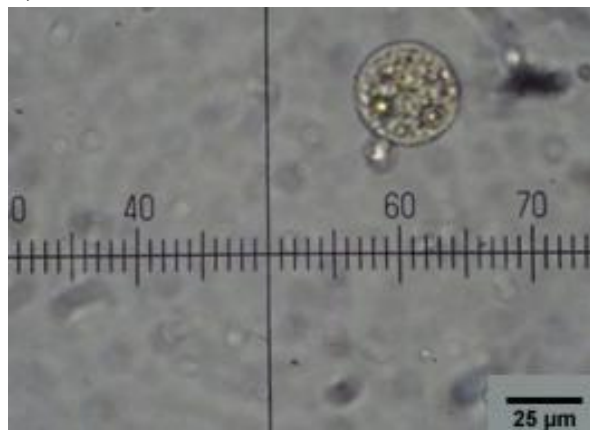
Mercado 11	Freq	1	3	4
	%	25.0%	75.0%	100.0%
Mercado 12	Freq	0	8	8
	%	0.0%	100.0%	100.0%
Mercado 13	Freq	1	2	3
	%	33.3%	66.7%	100.0%
Mercado 14	Freq	1	3	4
	%	25.0%	75.0%	100.0%
Feira 15	Freq	1	3	4
	%	25.0%	75.0%	100.0%
Feira 16	Freq	0	9	9
	%	0.0%	100.0%	100.0%
Total	Freq	11	39	50
	%	22.0%	78.0%	100.0%

### 3.3. Resultados das análises parasitológicas

#### 3.3.1. Resultados da pesquisa de parasitas

Foram identificados 5 géneros de protozoários: *Entamoeba* (Figura 3.6 A), *Amoeba* (Figura 3.6 B), *Balantidium* (Figura 3.6 C-D), *Paramecium* (Figura 3.6 E) e *Colpoda* (Figura 3.6 F).

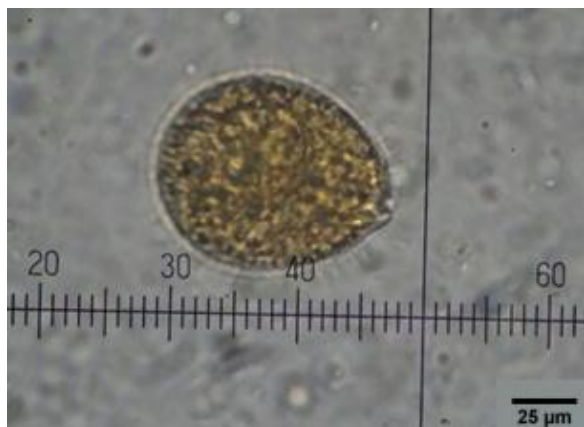
A)



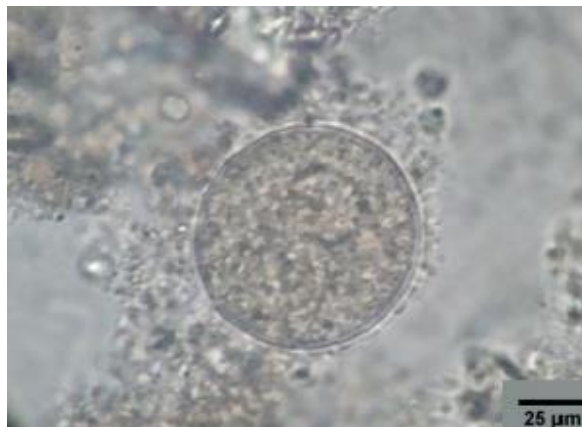
B)



C)



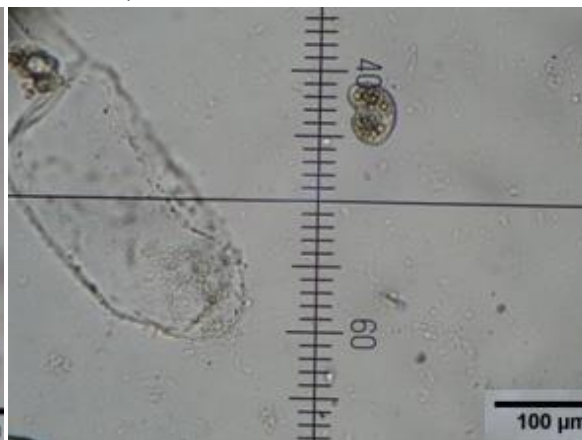
D)



E)



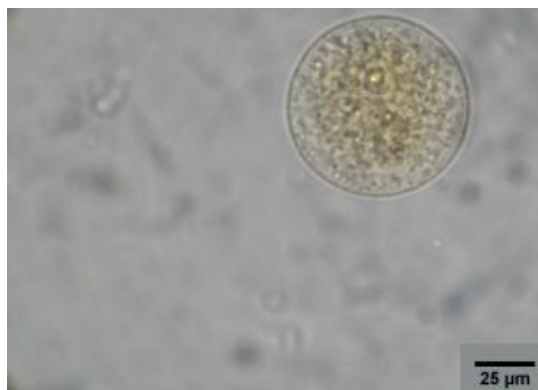
F)



**Figura 3.6 – Aspecto dos diferentes protozoários observados.**

(A) Quisto de *Entamoeba* spp. (corado com lugol) encontrado em cebolinho de cultivo convencional; (B) Trofozoíto de *Amoeba* spp. (corada com lugol) em alface de cultivo biológico; (C) Trofozoíto de *Balantidium* spp. (corado com lugol) em alface de cultivo convencional; (D) Quisto de *Balantidium* spp. em agrião de cultivo biológico; (E) *Paramecium* spp. em espinafre de cultivo convencional; (F) *Colpoda* spp. em agrião de cultivo biológico. (Originais)

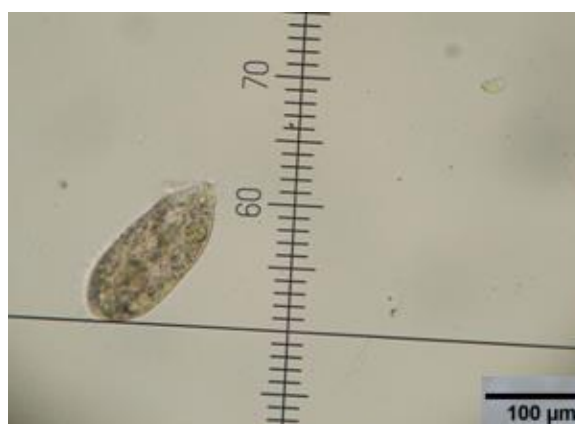
No caso dos protozoários pertencentes ao género *Entamoeba*, em algumas das amostras, foi identificada a espécie *Entamoeba coli* (Figura 3.7). Contudo, não foi possível fazer a identificação de outras espécies de *Entamoeba* apenas com o uso da microscopia.



**Figura 3.7- Quisto de *Entamoeba coli*.**

Corado com lugol e encontrado em espinafre proveniente de cultivo convencional. (Original)

Foram observados vários protozoários de vida livre (ciliados e flagelados) dos quais não foi possível identificar o género pertencente (Figura 3.8).



**Figura 3.8– Aspecto de alguns dos protozoários de vida livre observados.**

Ciliado de vida livre encontrado em agrião de origem convencional. (Original)

Foram também identificadas larvas e ovos de nemátodes de vida livre (Figuras 3.9 A, 3.9 B, 3.9 C, 3.9 D), no entanto, não foi possível fazer a identificação dos géneros envolvidos. Uma importante característica na identificação morfológica de nemátodes de vida livre é a presença de esófago em forma de bulbo, conforme pode-se observar na Figura 3.9 D.

A)



B)



C)



D)



**Figura 3.9– Aspecto das diferentes larvas de nemátodes e ovos observados.**

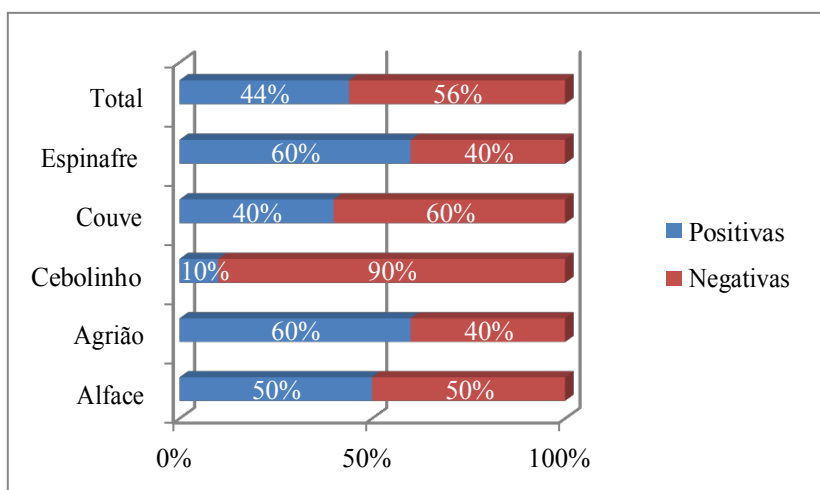
(A) Nemátode fêmea de vida livre (corado com lugol) em espinafre de cultivo convencional; (B) Ovo de nemátode de vida livre (corado com lugol) em espinafre de cultivo convencional; (C) Ovo de nemátode de vida livre encontrado em espinafre de cultivo convencional; (D) Nemátode de vida livre encontrado em cebolinho de cultivo convencional. (Originais)

Quanto a outros microorganismos de vida livre, foram encontrados variados rotíferos (Figura 3.10) sendo encontrados com a mesma prevalência, tanto em amostras biológicas quanto convencionais.

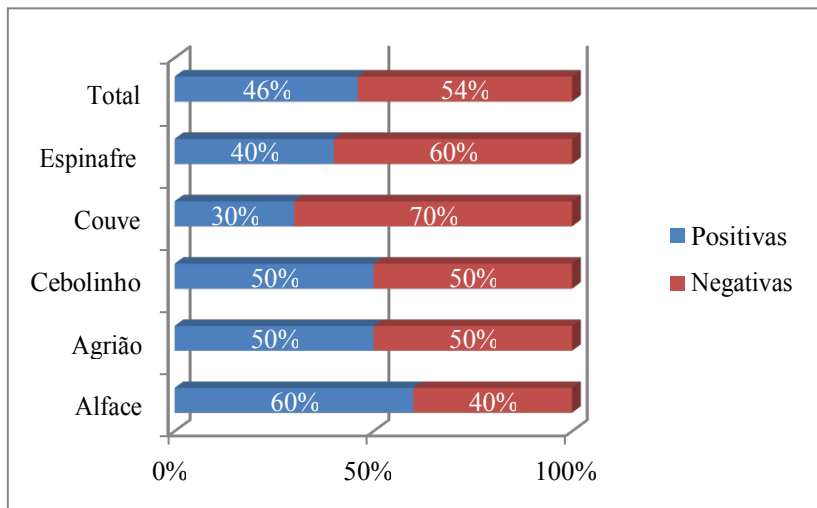


**Figura 3.10 – Aspecto de alguns dos rotíferos observados.**  
Rotífero encontrado em agrião de cultivo convencional. (Original)

Das 100 amostras avaliadas, 45 foram positivas a pelo menos um género de protozoário e/ou nemátode, o correspondente a 45% das amostras. No caso das amostras biológicas, a frequência de contaminação foi de 44% (22/50) e de 46% (23/50) nas convencionais, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de cultivo, teste de Fisher,  $p = 1,000$ . A contaminação em espinafre, couve-galega e agrião foi maior nas amostras de origem biológica, já o cebolinho e a alface provenientes de agricultura convencional, apresentaram maior contaminação (Figuras 3.11 e 3.12).



**Figura 3.11- Frequência de contaminação em vegetais de origem biológica (n=50).**



**Figura 3.12- Frequência de contaminação em vegetais de origem convencional (n=50).**

Contudo, pode-se observar na Tabela 3.7, que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) quanto à contaminação parasitária entre as variedades de vegetais, para os dois tipos de cultivo.

**Tabela 3.7 – Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) entre as variedades de vegetais. (n=50).**

	Biológico		Convencional		Sig.
	N	%	N	%	
Alface	5	50.0%	6	60.0%	1,000
Agrião	6	60.0%	5	50.0%	1,000
Couve	4	40.0%	3	30.0%	1,000
Espinafre	6	60.0%	4	40.0%	1,000
Cebolinho	1	10.0%	5	50.0%	0,658

Observou-se também que quanto ao grupo biológico, todas as amostras contaminadas com protozoários e/ou nemátodes (100%) não estavam contaminadas com *E. coli*, sendo a diferença estatisticamente significativa, teste de Fisher,  $p = 0,001$ . Contudo, no grupo convencional, 73,9% das amostras contaminadas com protozoários e/ou nemátodes apresentaram contaminação fecal, não havendo diferenças estatisticamente significativas, teste de Fisher,  $p = 0,733$ .

Foi avaliada a prevalência de contaminação de protozoários e nemátodes em relação à proveniência das amostras, sendo encontrada uma associação altamente significativa ( $p=0,001$ ), para os dois tipos de cultivo. No grupo biológico, encontramos os Mercados 2 e 3 com proporções de amostras contaminadas significativamente mais elevadas do que o esperado,  $\chi^2 (5) = 22.962$ ,  $p = 0,001$ . Constatou-se que todas as



amostras de origem biológica apresentaram pelo menos duas amostras contaminadas por cada mercado avaliado (Tabela 3.8).

**Tabela 3.8- Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) em amostras biológicas de acordo com a proveniência (n=50).**

Proveniência	Nº de hortaliças amostradas	Nº de amostras positivas	Prevalência
Mercado 1	25	3	12%
Mercado 2	9	7	78%
Mercado 3	4	4	100%
Mercado 4	3	2	66,66%
Mercado 5	4	2	50%
Mercearia 6	5	4	80%
Total	50	22	44%

No grupo convencional, observou-se que todas as amostras recolhidas dos Mercados 8 e 13 estavam contaminadas, no entanto, os Mercados 7, 11, 12 e 14 não apresentaram nenhuma amostra contaminada (Tabela 3.9). Também foi observado que a Feira 16 mostrou uma proporção de amostras contaminadas significativamente mais elevada do que o esperado,  $\chi^2 (9) = 32.667$ ,  $p = 0,001$ .

**Tabela 3. 9- Frequência de contaminação (protozoários e/ou nemátodes) em amostras convencionais de acordo com a proveniência (n=50).**

Proveniência	Nº de hortaliças amostradas	Nº de amostras positivas	Prevalência
Mercado 7	5	0	0%
Mercado 8	3	3	100 %
Mercado 9	5	4	80%
Mercado 10	5	3	60%
Mercado 11	4	0	0%
Mercado 12	8	0	0%
Mercado 13	3	3	100%
Mercado 14	4	0	0%
Feira 15	4	2	50%
Feira 16	9	8	89%
Total	50	23	46%

Foram identificados 2 géneros de parasitas intestinais: *Balantidium* e *Entamoeba*. A prevalência de parasitas intestinais neste estudo foi de 12% (12/100), provenientes de 6 amostras de origem biológica e 6 de origem convencional. Não foi encontrada nenhuma associação quanto à presença de parasitas

intestinais em relação ao tipo de cultivo ( $p = 1,000$ ) e a presença de *E. coli* ( $p=0,601$ ). Destas 12 amostras, fez-se a comparação de acordo com a variedade de vegetais contaminados com parasitas intestinais, sendo observado que 4 amostras eram de alface, 4 de agrião, 1 de couve-galega, 2 de cebolinho e 1 de espinafre, contudo as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 3.13).

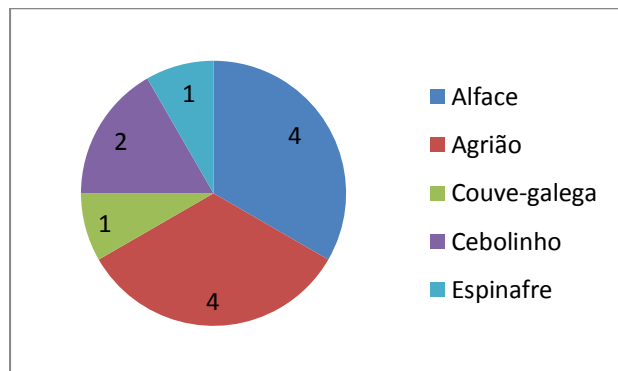


Figura 3.13- Número de amostras com parasitas intestinais em relação à variedade de vegetal ( $n= 12$ ).

Contudo, foi encontrada uma associação significativa entre os parasitas intestinais e a proveniência das amostras, para os dois tipos de cultivo. No grupo biológico, encontramos o Mercado 2 e a Mercearia 6 com proporções de amostras contaminadas com parasitas intestinais significativamente mais elevadas do que o esperado (44,4% e 40,0%),  $\chi^2 (5) = 17.593$ ,  $p = 0,004$  (Tabela 3.10).

Tabela 3.10- Frequência de parasitas intestinais entre os diferentes mercados de origem biológica ( $n=50$ ).

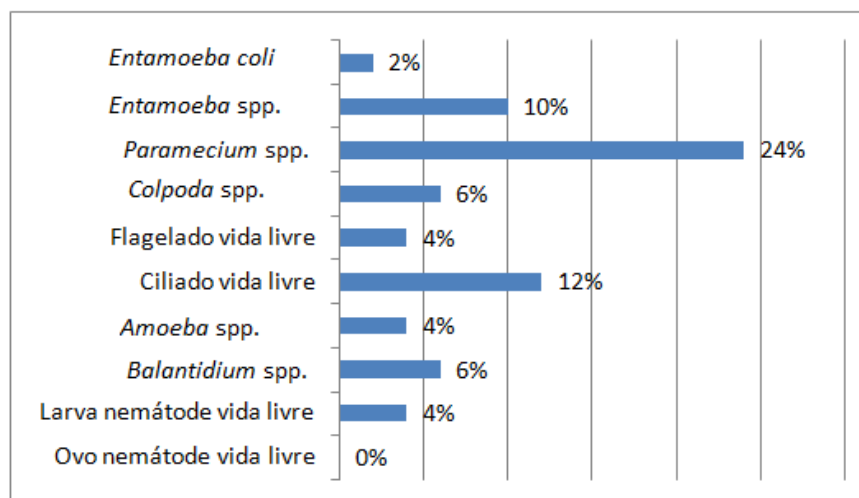
		Parasitas intestinais		Total
		Negativo	Positivo	
Mercado 1	Freq.	25	0	25
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 2	Freq.	5	4	9
	%	55,6%	44,4%	100,0%
Mercado 3	Freq.	4	0	4
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 4	Freq.	3	0	3
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 5	Freq.	4	0	4
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercearia 6	Freq.	3	2	5
	%	60,0%	40,0%	100,0%
Total	Freq.	44	6	50
	%	88,0%	12,0%	100,0%

No grupo convencional, encontramos o Mercado 10 com uma proporção de amostras contaminadas com parasitas intestinais significativamente mais elevada do que o esperado (60,0%) ,  $\chi^2 (9) = 17.645$ ,  $p = 0,040$  (Tabela 3.11).

**Tabela 3.11- Frequência de parasitas intestinais entre os diferentes mercados de origem convencional ( $n=50$ ).**

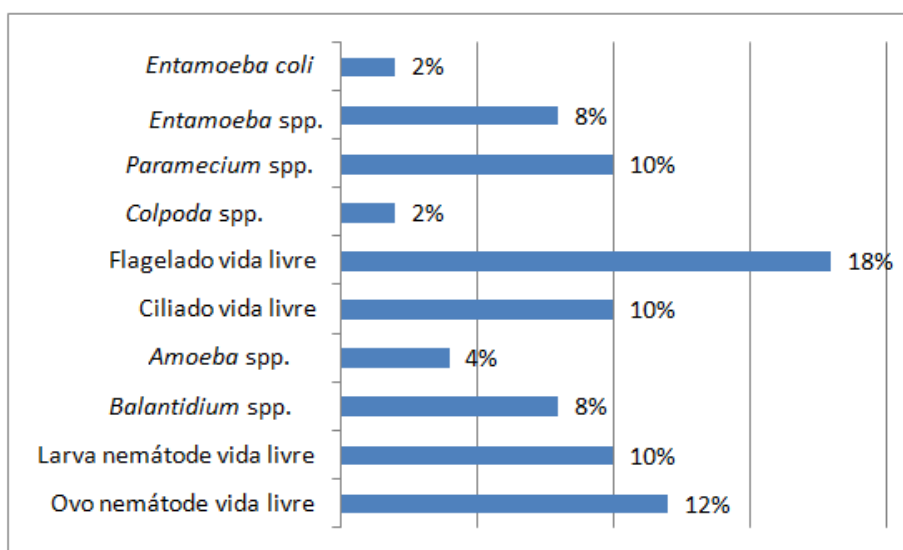
		Parasitas intestinais		Total
		Negativo	Positivo	
Mercado 7	Freq	5	0	5
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 8	Freq	2	1	3
	%	66,7%	33,3%	100,0%
Mercado 9	Freq	4	1	5
	%	80,0%	20,0%	100,0%
Mercado 10	Freq	2	3	5
	%	40,0%	60,0%	100,0%
Mercado 11	Freq	4	0	4
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 12	Freq	8	0	8
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 13	Freq	3	0	3
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Mercado 14	Freq	4	0	4
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Feira 15	Freq	3	1	4
	%	75,0%	25,0%	100,0%
Feira 16	Freq	9	0	9
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Total	Freq	44	6	50
	%	88,0%	12,0%	100,0%

Para os dois tipos de cultivo, foram calculadas as frequências de protozoários e nemátodes, podendo ser observados nos Anexos IX (amostras de origem biológica) e Anexo X (origem convencional). Nas amostras de origem biológica, observou-se maior frequência de *Paramecium* spp. (24%) e ciliados de vida livre (12%). Não foram encontrados ovos de nemátodes, no entanto, foram encontradas algumas larvas em 4% das amostras (Figura 3.14).



**Figura 3.14- Frequência de protozoários e nemátodes em amostras de origem biológica (n=50).**

Quanto às amostras convencionais, observou-se maior prevalência de flagelados de vida livre (18%) e ovos de nemátodes (12%). A prevalência de *Balantidium* spp. foi ligeiramente maior (8%), mas não foi significativa (Figura 3.15).



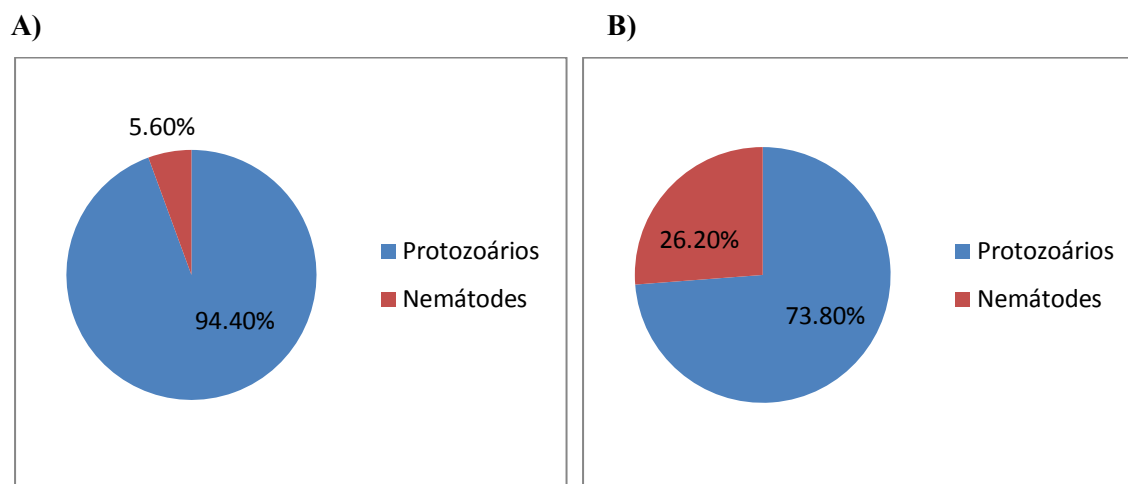
**Figura 3.15- Frequência de protozoários e nemátodes em amostras de origem convencional (n=50).**

Das 100 amostras analisadas, 20% (20/100) apresentaram contaminação múltipla de no mínimo dois gêneros de protozoários e/ou nemátodes, sendo respectivamente 9 amostras de cultivo biológico (18%) e 11 amostras de cultivo convencional (22%) (Tabela 3.12). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre nenhuma das variáveis analisadas em relação à contaminação múltipla das amostras ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.12- Frequência de amostras contaminadas com no mínimo dois gêneros de protozoários e/ou nemátodes. a) Origem biológica (n=50); b) Origem convencional (n=50).**

A)			B)		
Contaminação (Origem biológica)	Frequência	Percentagem	Contaminação (Origem convencional)	Frequência	Percentagem
Negativa	41	82%	Negativa	39	78%
Positiva	9	18%	Positiva	11	22%
Total	50	100%	Total	50	100%

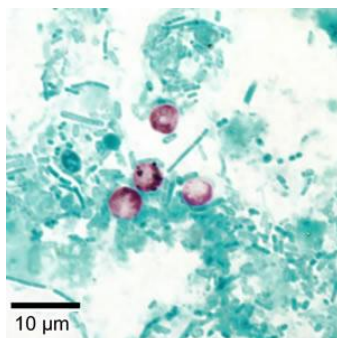
Foi feita comparação entre a prevalência de protozoários (vida livre e intestinais) e nemátodes (ovos e larvas) e observou-se que nas amostras de origem biológica, a prevalência de nemátodes foi muito escassa, com apenas 5,6% de contaminação com larvas de nemátodes de vida livre, enquanto que nas amostras de origem convencional houve uma frequência de 26,2% de amostras contaminadas com larvas e ovos de nemátodes de vida livre (Figura 3.16 A e B).



**Figura 3.16- Frequência de protozoários e nemátodes. a) Origem biológica (n= 50); b) Origem convencional (n= 50).**

### 3.3.2. Resultado da pesquisa de *Cryptosporidium* spp. pela coloração Ziehl - Neelsen

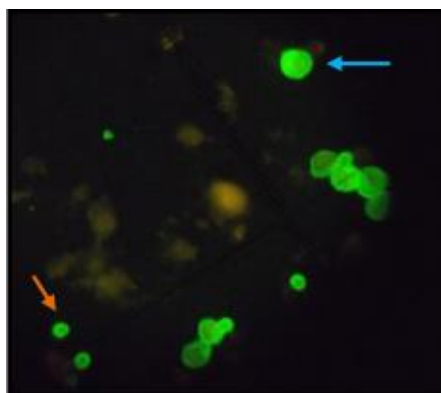
Em todas as amostras foi feita a observação dos esfregaços para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., no entanto, nenhuma delas apresentou-se positiva. O resultado esperado seria conforme a Figura 3.17.



**Figura 3.17-** Oocistos de *Cryptosporidium* spp. após coloração Ziehl -Neelsen. (CDC, 2013c).

### 3.3.3. Resultado da pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Directa (IFD)

Nas 20 amostras analisadas, não foram observadas estruturas morfológicas compatíveis com quistos de *Giardia* spp. ou oocistos de *Cryptosporidium* spp. O resultado esperado seria conforme a Figura 3.18.



**Figura 3.18-** Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (seta laranja) e quistos de *Giardia* spp. (seta azul) por IFD em lâmina de controlo positivo, 400x. (Leal, 2015).

## 4. Discussão

A média de contaminação por coliformes termotolerantes foi significativamente menor nas amostras de origem biológica. Dos 100 vegetais analisados, um total de 14% (7/50) de origem biológica e 28% (14/50) de origem convencional apresentaram valores de coliformes termotolerantes mais elevados do que o limite máximo de quantificação da técnica utilizada ( $\geq 1,10 \times 10^3$  NMP/g). Contudo, estas diferenças observadas entre os dois tipos de cultivo, não foram estatisticamente significativas, não sendo também observadas diferenças significativas para nenhuma variedade de vegetal amostrado.

No total, 56 amostras (56%) apresentaram contaminação fecal, com prevalência de 34% (17/50) em amostras de origem biológica e 78% (39/100) de origem convencional. A contaminação fecal em amostras convencionais foi significativamente superior em relação às de origem biológica. Também foi observado que as amostras convencionais apresentaram associação significativa entre a presença de contaminação fecal e a presença de valores elevados de coliformes termotolerantes ( $\geq 1,10 \times 10^3$  NMP/g). Assim, todas as 14 amostras de origem convencional com valores elevados de coliformes termotolerantes apresentaram simultaneamente contaminação fecal. Sabe-se que a contaminação por *E. coli* indica má qualidade do solo e/ou da água utilizada no cultivo dos alimentos, podendo estar associada ao uso de adubos com dejectos fecais ou irrigação com água contaminada, além disso, as más práticas de manipulação dos produtores e vendedores dos alimentos também podem ter contribuído para a contaminação fecal destes alimentos. Não foram encontradas diferenças significativas entre nenhuma das variedades de hortaliças amostradas quanto à prevalência de contaminação fecal, independente do tipo de cultivo. Contudo, houve uma relação estatisticamente significativa entre a proveniência das amostras quanto à prevalência de *E. coli*, para os dois tipos de cultivo.

Na literatura, há poucos estudos a comparar a contaminação potencialmente patogénica (tanto microbiológica quanto parasitológica) entre os alimentos provenientes de sistemas de cultivo biológico e convencional e os poucos estudos existentes ainda são controversos. Smith (1993) menciona que a contaminação microbiológica depende das práticas de produção adoptadas na propriedade e das condições ambientais. Com isso, independente do tipo de cultivo, os alimentos estão sujeitos aos mesmos riscos de contaminação. Bourn & Prescott (2002) concluíram que não há evidências de que os alimentos biológicos possam ser mais susceptíveis à contaminação microbiológica que os alimentos convencionais. Bohaychuk *et al.* (2009) analisaram diferentes alimentos (entre eles alface e espinafre) de mercados e quintas do Canadá e observaram que a diferença de contaminação por *E. coli* entre os vegetais de origem biológica e convencional não foi significativa. Estes resultados também foram semelhantes aos reportados por Ryu *et al.* (2014) que analisaram a qualidade microbiológica entre 11 variedades de vegetais adquiridos em diferentes mercados de origem biológica e convencional da Coreia.

Mukherjee *et al.* (2004) também não encontraram diferenças significativas quanto ao risco microbiológico nos alimentos biológicos certificados em comparação com os convencionais. Como reportado por estes autores, é de ser realçada a importância de alimentos biológicos certificados (com compostagem superior a 12 meses), pois estes mostraram muito menor probabilidade de contaminação fecal do que os não certificados, sugerindo que uma compostagem inadequada aumenta significativamente os riscos de contaminação fecal. Os estrumes de origem animal que sofreram o processo de compostagem por 6 a 12 meses tinham 19 vezes mais probabilidade de estarem contaminados com *E. coli*. Além disso,

os alimentos com certificação sofrem frequentemente uma série de procedimentos que não permitem que o esterco animal seja utilizado antes da sua correcta compostagem.

Contudo, existem alguns trabalhos como Mukherjee *et al.* (2007) que reportaram que os alimentos de origem biológica obtiveram maior contaminação por *E. coli* do que os convencionais, neste caso, o esterco de origem animal utilizado pelas quintas biológicas, seria um factor de risco. Mais recentemente, Pan *et al.* (2015) sugeriram que alimentos cultivados em sistema biológico são mais sensíveis à contaminação bacteriana; os vegetais vendidos em mercados de agricultores da Califórnia (EUA) tinham 2 vezes mais probabilidade de contaminação por *Salmonella* spp. do que os vegetais cultivados em quintas de cultivo convencional.

Em Portugal, foram publicados apenas alguns estudos microbiológicos no que se refere aos vegetais de origem convencional. Santos *et al.* (2012) demonstraram a presença de bactérias patogénicas como *Listeria monocytogenes* e *E. coli* (VTEC) em vegetais prontos a consumir. Contudo, Guerra *et al.* (2001) não encontraram contaminação microbiana (*Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*) em nenhuma das amostras de vegetais *in natura* analisadas. A incidência de bactérias patogénicas em vegetais de origem biológica varia de acordo com os diferentes estudos, sendo que a prevalência de *Salmonella* spp. pode variar entre 0,4 e 23,1%, *L. monocytogenes* entre 1,1 e 20% e *E. coli* O157:H7 pode ser superior a 1,9% (Maffei *et al.*, 2016).

Quanto às análises parasitológicas, 45 amostras (45%) apresentaram contaminação com pelo menos um género de protozoário e/ou nemátode, sendo 44% (22/50) de origem biológica e 46% (23/50) convencional, não sendo encontradas diferenças significativas entre os dois tipos de cultivo. Estes resultados vão de encontro com Kłapeć & Borecka (2012), um estudo feito na Polónia entre 2008 e 2009, sendo dos poucos trabalhos que compara de forma sistemática a contaminação parasitológica entre vegetais, que apesar de encontrar valores maiores de contaminação em vegetais convencionais, não observou diferenças significativas entre os dois tipos de cultivo.

Em oposição, Kajiya *et al.* (2006) afirma que os vegetais biológicos podem apresentar maior risco de contaminação com ovos de helmintas, quistos e oocistos de protozoários do que os de origem convencional. Foi observada maior contaminação por protozoários e nemátodes nas amostras de alface e de couve-galega de agricultura biológica, enquanto o agrião e o cebolinho de origem convencional apresentaram maior contaminação. Para o espinafre, a frequência de contaminação foi igual para os dois tipos de cultivo. Sabe-se que os estudos nesta temática utilizam diversas técnicas de recuperação dos parasitas, o que torna difícil a tarefa de comparação dos resultados que também podem variar conforme o alimento analisado, o tamanho da amostra, entre outros factores. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que as hortaliças folhosas, apresentam em geral maior contaminação do que outros tipos de vegetais (Uga *et al.*, 2009; Abougrain *et al.*, 2010).

Foi observado que, quanto ao grupo biológico, todas as amostras contaminadas por protozoários e/ou nemátodes não apresentaram contaminação fecal, contudo tal relação não foi observada nas amostras convencionais, visto que mais de 70% delas apresentaram contaminação fecal e parasitária. Também foi observado que a frequência de protozoários e/ou nemátodes está relacionada com a proveniência das amostras, sendo observados valores estatisticamente significativos para os dois tipos de cultivo. Isso



indica que a probabilidade de contaminação nas amostras está dependente das quintas e campos que fornecem vegetais para os mercados do qual as amostras foram adquiridas, revelando disparidades entre os diferentes mercados. No entanto, não se pode tirar mais informações sobre este aspecto porque não sabemos a proveniência dos fornecedores de alimentos a estes mercados analisados. Além disso, por questões de anonimato, apenas mencionamos indicações genéricas sobre os mercados que foram avaliados neste trabalho.

Foram identificados 5 géneros de protozoários: *Entamoeba*, *Amoeba*, *Balantidium*, *Paramecium* e *Colpoda*, sendo também observados vários ovos e nemátodes de vida livre, além de alguns protozoários de vida livre (ciliados e flagelados) não identificados e rotíferos aquáticos. As amostras de origem biológica apresentaram maior frequência de ciliados de vida livre e *Paramecium* spp. Já as amostras convencionais apresentaram maior frequência de flagelados de vida livre e de ovos de nemátodes de vida livre. Em um estudo feito no Irão, com vegetais convencionais, também foram encontrados protozoários intestinais como *Entamoeba* spp. e protozoários de vida livre como *Amoeba* spp., larvas de nemátodes de vida livre e flagelados em vegetais comercializados em mercados e quintas na capital do país (Gharavi *et al.*, 2002).

Quanto aos outros microorganismos de vida livre encontrados (rotíferos) pode-se dizer que a frequência foi semelhante, independente do tipo de cultivo. Apesar destes microorganismos e todos os outros protozoários e nemátodes de vida livre encontrados não serem patogénicos, há estudos que indicam um grande potencial de impacto destes na saúde humana. Os protozoários de vida livre, por exemplo, podem indirectamente infectar humanos por abrigar bactérias patogénicas, podendo actuar como vectores (Chavate *et al.*, 2014) e o mesmo ocorre com rotíferos e outros microorganismos. Além disso, podem abrigar oocistos ou quistos de protozoários patogénicos como *Cryptosporidium* ou *Giardia* (Fayer *et al.*, 2000). No entanto, são necessários mais estudos para a avaliação dos potenciais perigos para a saúde humana.

A frequência de contaminação por parasitas intestinais neste estudo foi de 12%. Foram reportados resultados semelhantes por Mohamed *et al.* (2016) que encontraram 13,5% de contaminação em vegetais *in natura* adquiridos em dois grandes mercados do Sudão. Valores muito menores foram encontrados por Coelho *et al.* (2001) com prevalência de apenas 3,9% em hortaliças *in natura* comercializadas no Brasil.

O género *Balantidium*, também foi reportado em outros trabalhos que analisaram amostras de agrião, alface e rúcula comercializados em São Paulo, Brasil (Barnabé *et al.*, 2010). No entanto, diferente da maioria dos estudos, neste trabalho não foi encontrado nenhum nemátode patogénico. Foi encontrada uma frequência superior de protozoários em relação à de nemátodes (94,40%) em amostras de origem biológica e (73,8%) em amostras convencionais.

Os protozoários intestinais encontrados neste estudo, podem ser de origem humana e/ou animal. A patogenicidade de *Balantidium* spp. é relativamente baixa, afetando mais severamente indivíduos imunocomprometidos a partir da ingestão de quistos em água ou alimentos contaminados que podem ser de origem humana ou de estrume de animais, como os suínos. Já a espécie *Entamoeba coli*, é comensal, sem nenhum risco directo à saúde humana, no entanto, este pode servir como indicador de contaminação fecal, que pode ter ocorrido com água de irrigação contaminada, estrume contaminado ou manipulação inadequada dos alimentos. Neste estudo, foi também encontrada uma associação significativa entre os

parasitas intestinais e a proveniência das amostras, para os dois tipos de cultivo. Observou-se que 20% das amostras apresentaram contaminação múltipla de no mínimo dois géneros de protozoários e/ou nemátodes, sendo respectivamente 9 amostras de cultivo biológico (18%) e 11 amostras de cultivo convencional (22%).

No presente estudo, a identificação de *Entamoeba coli* limitou-se à detecção da presença de mais de 4 núcleos e do tamanho dos quistos, que são muito maiores do que das outras espécies. Contudo, na maioria dos casos, não foi possível obter resultados conclusivos, pois estas não são características de diagnóstico muito fiáveis visto haver várias espécies de *Entamoeba* semelhantes entre si, o que não possibilitou esclarecer a presença de *Entamoeba histolytica* (ameba patogénica). Com isso, todas as espécies não identificadas foram genericamente denominadas de *Entamoeba* spp.

Apesar de ser reportada contaminação por *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Giardia* em diversos tipos de vegetais (Beuchat, 1996; Monge & Chinchilla, 1996; Amahmid *et al.*, 1999), neste estudo não foram encontradas estruturas parasitárias de nenhum destes protozoários. Em um estudo feito na Noruega, foi encontrada uma frequência de 6% para *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de frutas e vegetais analisadas entre o período de 1999 a 2001 (Robertson & Gjerde, 2001). Em Portugal, foi feita uma pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* através da técnica de IFD em 4 variedades de vegetais prontos a comer (salsa, rúcula, rebentos de soja e canónigos;  $n=14$ ), contudo, todas as amostras foram negativas (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003), o que não exclui a hipótese de os mesmos serem observados numa amostragem maior ou em outros tipos de vegetais.

A avaliação microbiológica e parasitológica dos alimentos pode permitir uma análise adequada da Segurança Alimentar, informando a real situação envolvida na produção, transporte e manuseamento de alimentos, no entanto, a literatura ainda é bastante controversa no que se refere à qualidade sanitária para os alimentos de origem biológica. Contudo, a maioria dos trabalhos sugere que o modo de produção não interfere de maneira significativa na qualidade dos vegetais. Certamente, as práticas inadequadas de produção, independente do tipo de cultivo, podem contribuir para maiores níveis de contaminação (Arbos *et al.*, 2010).

Os resultados agora disponibilizados indicam que os vegetais de origem biológica apresentaram melhor qualidade sanitária do que os de origem convencional quanto à contaminação microbiológica. No caso da contaminação parasitológica, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois tipos de cultivo. Talvez a certificação do modo de produção biológico propicie um controlo mais rigoroso, estimulando melhores práticas agrícolas. Estes resultados reforçam a importância dos alimentos provenientes de agricultura biológica, uma vez que, são poucos os estudos a avaliar a qualidade sanitária destes alimentos, sendo primordial a divulgação destas informações em escolas, *workshops* e através dos *media* para o maior conhecimento da segurança alimentar relacionada com o consumo de produtos hortícolas vendidos em pequenos mercados de agricultura biológica e convencional na área metropolitana de Lisboa.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Considerando a escassez de estudos sobre a ocorrência de contaminação fecal e parasitária em vegetais comercializados em diversos mercados de Lisboa, este trabalho contribui para o conhecimento das condições hígio-sanitárias de vegetais comercializados na Área Metropolitana de Lisboa e o seu impacto na Saúde Pública. Além disso, ao que se sabe, é dos primeiros em Portugal a divulgar resultados obtidos quanto à segurança microbiológica e parasitológica entre vegetais provenientes de cultivo biológico e convencional.

Podemos observar que os vegetais provenientes de cultivo biológico foram mais seguros quanto aos critérios microbiológicos e parasitológicos avaliados. Pode-se observar que a partir destes resultados, não é recomendado o consumo *in natura* destes alimentos sem prévia higienização, que deve incluir uma pré-lavagem com água para a remoção dos resíduos e sujidades seguida de desinfecção, um procedimento que reduz o número de microorganismos através da utilização de produtos específicos. Contudo, uma vez que esta etapa não remove todos os organismos potencialmente patogénicos presentes em um alimento, existe uma necessidade fulcral de implementação de boas práticas de produção e de manipulação, independente do tipo de cultivo, visto que, as práticas inadequadas podem comprometer de maneira significativa a qualidade sanitária de um alimento.

Por fim, em trabalhos futuros e de forma a tornar os resultados ainda mais fidedignos, sugere-se a utilização de técnicas de PCR como ferramenta de auxílio na identificação de espécies de *Entamoeba* para avaliação do impacto destes protozoários na Saúde Pública. Também poderiam ser feitas análises microbiológicas para detecção da presença de *Salmonella* spp. e *E. coli* patogénicas, para uma melhor avaliação destes alimentos. Além disso, a realização de amostragens mais alargadas, seria fundamental para a melhor compreensão das condições microbiológicas e parasitológicas dos alimentos de origem biológica, que têm se tornado cada vez mais populares não só em Portugal como em todo o mundo.

## 6. Referências bibliográficas

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. (2008) Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123,121–129.

Abougrain, A. K., Nahaisi, M. H., Madi, N. S., Saied, M. M., Ghenghesh, K. S. (2010) Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food Control* 21(5),760-762.

Adam, R.D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14(3),447-475.

Al-Megrin, W.A.I. (2010) Prevalence of intestinal parasites in leafy vegetables in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Zoological Research* 6, 190-195.

Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., De Delgado, M. L., Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A., Da Cosa, J. M. C. (2010) Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. *Korean Journal of Parasitology* 48(1), 43–48.

Alum, A., Rubino, J. R., Ijaz, M. K. (2010) The global war against intestinal parasites-should we use a holistic approach? *International Journal of Infectious Diseases* 14(9), 732–738.

Alves, M., Ribeiro, A.M., Neto, C., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Antunes, F., Matos, O. (2006) Distribution of *Cryptosporidium* species and subtypes in water samples in Portugal: a preliminary study. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 53 (1), 24-25.

Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K. (1999) The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. *International Journal of Food Microbiology* 49, 19–26.

Amoah,P.,Drechsel, P., Abaidoo, R.C., Ntow, W.J. (2006) Pesticide and Pathogen Contamination of Vegetables in Ghana’s Urban Markets. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 1-6.

APHA (1992) Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. (Ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: *American Public Health Association*, 336-383 pp.

Araújo, M.F.F. & Medeiros, M. L. Q., (2013). *Protozoários de vida livre em açudes do Rio Grande do Norte*. Natal. Editora UFRN, Natal, 60 pp.

Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. De, Stertz, S. C., Carvalho, L. A. (2010) Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Ciência E Tecnologia de Alimentos* 30, 215–220.

Axelsson-Olsson, D.,Waldenstrom, J., Broman, T., Olsen, B., Holmberg, M. (2005) Protozoan

*Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 987–992.

Balabanova Y., Klar S., Delere Y., Wilking H., Faber M.S., Gillesberg Lassen S., Gilsdorf A., Dupke S., Nitschke M., Sayk F., Grunow R., Krause G. (2013) Serological evidence of asymptomatic infections during *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany in 2011. *PLoS One* 8(9), 1-4.

Baqui, A.H., Sack, R.B., Black, R.E., Haider, K., Hossain, A., Alim, A.R., Yunus, M., Chowdhury, H.R., Siddique, A.K. (1992) Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *The Journal of Infectious Diseases* 166, 792-796.

Baré, J., Sabbe, K., Huws, S., Vercauteren, D., Braeckmans, K., van Gremberghe, I., Favoreel, H., Houf, K. (2010) Influence of temperature, oxygen and bacterial strain identity on the association of *Campylobacter jejuni* with *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Ecology* 74, 371–381

Barker, J., Humphrey, T.J., Brown, M.W.R. (1999) Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiology Letters* 173, 291–295.

Barnabé, A. S., Ferraz, R.R. N., Pincinato, E. de C., Ferreira, Gomes, R. C.F., Galleguillos, T.G.B., Cerqueira, M.Z., Soares, E.G.L., Lage, P.S., Araújo, C.X., Szamszoryk, M., Massara, C.L. (2010) Análisis comparativo de los métodos para la detección de parásitos en las hortalizas para el consumo humano. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2(1), 21–27.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. (2010) Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12(9), 2385–2397.

Beuchat, L. R. (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59,204-216.

Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B., Clavero, M.R. (1998) Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection* 61,1305- 1311.

Beuchat, L.R. & Scouten, A.J. (2002) Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology* 92, 382–395.

Birky, C.W. (2005) Sex: Is *Giardia* doing it in the dark?. *Current Biology* 15, 56–58.

Blumenthal, U.J & Peasey, A. (2002) Critical review of epidemiological evidence of the health effects of wastewater and excreta use in agriculture. *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, 35 pp.

Bohaychuk, V.M., Bradbury, R.W., Dimock, R., Fehr, M., Gensler, G.E., King, R.K., Rieve, R., Romero Barrios, P. (2009) A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal of Food Protection* 72(2),415-420.

Bourn, D. & J. Prescott. (2002) A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(1), 1-34.

Buck, J.W., Walcott, R.R., Beuchat, L.R. (2003) Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress* 21 (1), 1-10.

Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Barkema, H.W., McClure, J.T. (2011) Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *Journal of food protection* 74(11),1944–1955. doi: 10.4315/0362–028X.JFP-11–107 PMID: 22054199.

Cacciò, S.M. & Ryan, U. (2008) Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160 (2),75–80.

Calretas, S. & Carvalho, A. (2003) Seis casos de fasciolíase hepática. *Medicina* 10(4), 185–192.

Campbell, J.V., Mohle-Boetani, J., Reporter, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M., Mandrell, R., Werner, S.B. (2001) An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *The Journal of Infectious Diseases* 183 (6),984–987.

Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., Antunes, P. (2013) Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology* 166(3),464–470.

Carleton, R.E. & Tolbert, M.K. (2004) Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminthes in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Veterinary Parasitology* 119(4) 319-326.

Casemore, D.P. (1991) Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology* 44, 445-451.

CDC (2013a) Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/Cryptosporidiosis/index.html>  
Acedido em: 13/06/16.

CDC (2013b)DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/> Acedido em: 13/06/16.

CDC (2013c) DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/gallery.html#oocystsacidfast> Acedido em:

12/07/16.

CDC(2015)Parasites - Cyclosporiasis-(Cyclospora Infection) Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html> Acedido em: 15/06/16.

CDC (2016) DPDx-Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/morphcomp.html> Acedido em 14/06/16.

Chau, H.L.Q., Thong, H.T., Chao, N.V., Hung, P.H.S., Hai, V.V., An, L.V., Fujieda, A., Ueru, T., Akamatsu, M. (2014) Microbial and Parasitic Contamination on Fresh Vegetables Sold in Traditional Markets in Hue City, Vietnam. *Journal of Food and Nutrition Research* 2(12), 959-964.

Chavatte, N., Baré, J., Lambrecht, E., Van Damme, I., Vaerewijck, M., Sabbe, K., Houf, K. (2014) Co-occurrence of free-living protozoa and foodborne pathogens on dishcloths: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 191, 89–96.

Chekabab, S. M., Paquin-Veillet, J., Dozois, C. M., Harel, J. (2013) The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiology Letters* 341(1), 1–12.

Cleaveland, S., Laurenson, M. K., Taylor, L. H. (2001) Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 356(1411), 991–999.

Coelho, L.M.P.S., Oliveira, S.M., Milman, M.H.S.A., Karasawa, K.A., Santos, R.P. (2001) Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 479-482.

Comissão Europeia (2001) Agricultura biológica: guia da regulamentação comunitária. *Direcção-Geral da Agricultura. Luxemburgo: Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias*. Disponível em <http://bookshop.europa.eu/pt/> Acedido em 12/05/16.

Conte, V.D., Colombo, M., Zanrosso, A.V., Salvador, M. (2004) Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul, *Infarma* 16 (11-12),83-84.

Dawson, D. (2005) Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology* 103(2), 207–227. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.032>

Direcção-Geral de Agricultura (2002) Situação da Agricultura em Portugal. *Comissão Europeia*. Disponível em [http://ec.europa.eu/agriculture/publi/reports/portugal/workdoc\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/publi/reports/portugal/workdoc_pt.pdf) Acedido em 15/06/16.

Directiva

2003/99/EC

Disponível

em

[http://www2.esb.ucp.pt/twt/seg\\_alim/legislacao/monitoringZoozones.pdf](http://www2.esb.ucp.pt/twt/seg_alim/legislacao/monitoringZoozones.pdf) Acedido em 20/05/16.

Doller, P.C., Dietrich, K., Filipp, N., Brockmann, S., Dreweck, C., Vonthein, R., Wagner-Wiening, C. Wiedenmann, A. (2002) Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerging Infectious Diseases* 8, 992–994.

Doyle Michael P. (1990) Fruit and Vegetable Safety-Microbiological Considerations. *Hortscience* 25(12), 1478-1482.

Duffy, T.L., Montenegro-Bethancourt, G., Solomons, N.W., Belosevic, M., Clandinin, M.T. (2013) Prevalence of giardiasis in children attending semi-urban daycare centres in Guatemala and comparison of 3 *Giardia* detection tests. *Journal of Health Population and Nutrition* 31(2), 290–293.

ECDC (2013) Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. *Stockholm, ECDC; 2013* Disponível em <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf> Acedido em 10/07/16.

EFSA (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, 10(3),2597,492pp. doi:10.2903/j.efsa.2012.259.

EFSA (2013a) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013, 11(4), 3129, 250pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.

EFSA (2013b) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin .Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal*, 11(1),3025, 138pp.

EFSA & ECDC (2015a) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015,13(1),3991, 165pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991

EFSA & ECDC (2015b) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015,13(12),4329, 191pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329

Ekdahl, K. & Andersson, Y. (2005) Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (6), 825-830.

Environment Agency (2002) The Microbiology of drinking water – Part 1. Water Quality and Public Health. 50pp. Disponível em [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/316838/mdwpart1.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316838/mdwpart1.pdf)



Acedido em: 10/07/16.

Espelage, W., Heiden, M., Stark, K., Alpers, K. (2010) Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health* 10,41, 1-9.

Falavigna, L.M., Freitas, C.B.R., Melo, G.C., Nishi, L., Araújo, S.M., Falavigna-Guilherme A.L. (2005) Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitologia Latinoamericana* 60, 144-149.

FAO/WHO (2008) Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: *Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series, 14. Rome*. 151pp. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i0452e.pdf> Acedido em 19/06/16.

FAO/WHO (2014) Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Born Parasites. *Microbiological Risk Assessment Series, 23. Rome*. 324pp. Disponível em <http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/> Acedido em 18/06/16.

Faust, E.C. (1938) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine* 18:169-83.

Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E., Cole, R. (2000) Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47,161–163.

FDA (2012) Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, 292pp. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf> Acedido em: 12/07/16.

Feng, Y. & Xiao, L. (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 24(1),110–140.

Fernandes, S., Beorlegui, M., Brito, M. J., Rocha, G. (2012) Protocolo de parasitoses intestinais. *Acta Pediátrica Portuguesa* 43(1), 35–41.

Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J. (2012) Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 25,420–449.

Food Standards (2001) Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/scienceandeducation/publications/guidelinesformicrobi1306.cfm>. Acedido em: 16 /07/16.

França, B. R., Bonnas, D. S., Maria, C., Silva, D. O. (2009) Qualidade higiênico-sanitária de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres na cidade de Uberlândia, MG-Brasil. *Bioscience Journal* 30 (1), 458–466.

Ganz, K. R., Clime, L., Farber, J. M., Corneau, N., Veres, T., Dixon, B. R. (2015) Enhancing the detection of *Giardia duodenalis* cysts in foods by inertial microfluidic separation. *Applied and Environmental Microbiology* 81(12), 3925–3933. <http://doi.org/10.1128/AEM.03868-14>

Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., Wellington, E.M.H. (2003) Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microbial Ecology* 46, 358–369.

Gharavi, M., Jahani, M., & Rokni, M. (2002) Parasitic contamination of vegetables from farms and markets in Tehran. *Iranian Journal of Public Health* 31(9), 83–86. Retrieved from <http://journals.tums.ac.ir/abs/295>

Gomiero, T., Pimentel, D., Paoletti, M. G. (2011) Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30(1-2), 95–124.

Gourabathini, P., Brandi, M. T., Redding, K. S., Gunderson, J. H., Berk, S. G. (2008) Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8), 2518–2525. <http://doi.org/10.1128/AEM.02709->

Guan, T.Y., Blank, G., Ismond, A. Van Acker, R. (2001) Fate of foodborne bacterial pathogens in pesticide products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 503–512.

Guan, T.Y., Blank, G., Holley, R.A. (2005) Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and on treated tomato plants. *Journal of Food Protection* 68, 296–304.

Guerra, M. M., McLauchlin, J., Bernardo, F. (2001) *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology* 18, 423–429. <http://doi.org/10.1006/fmic.2001.0421>

Haque, R. (2007) Human intestinal parasites. *Journal of Health, Population and Nutrition* 25(4), 387–391.

Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., Busta, F. F. (2003) Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2(1), 78–141.

Harvey, R.R., Zakhour, C.M., Gould, L.H. (2016) Foodborne Disease Outbreaks Associated with Organic Foods in the United States. *Journal of Food Protection* 11, 1828-2017.

Health Protection Agency( 2009) *Guidelines* for Assessing the Microbiological Safety of Ready- to-Eat

Foods. London: Health Protection Agency.  
Disponível em <https://www.gov.uk/government/publications/ready-to-eat-foods-microbiological-safety-assessment-guidelines> Acedido em 12/07/15.

Henriksen, S.A. & Pohlenz, J.F.L. (1981) Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22,594-596.

Hoffman, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L. (1934) The sedimentation – concentration method in schistosomiasis mansoni. *Journal of Public Health* 9, 281-298.

Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travaillé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Loic, F., Villena, I., La Carbona, S. (2016). Simultaneous detection of the protozoan parasites Toxoplasma, Cryptosporidium and Giardia in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiology* 57(3),36–44.

Horby, P.W., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Graham, C., Hawker, J.I., Hunter, P., Lane, C., Lawson, A.J., Mitchell, R.T., Reacher, M.H., Threlfall, E.J., Ward, L.R. (2003) A national outbreak of multi-resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and Infection* 130 (2),169–178.

Huamanchay, O., Genzlinger, L., Iglesias, M., Ortega, Y.R. (2004) Ingestion of Cryptosporidium oocysts by Caenorhabditis elegans. *Journal of Parasitology* 90,1176–1178.

Hughner R.S., McDonagh, P., Prothero, A., Schultz, C.J., Stanton, J., (2007) Who are organic food consumers? A compilation and review of why people purchase organic food. *Journal of Consumer Behaviour* 6, 94–110.

Huws, S.A., Morley, R.J., Jones, M.V., Brown, M.R., Smith, A.W. (2008) Interactions of some common pathogenic bacteria with Acanthamoeba polyphaga. *FEMS Microbiology Letters* 282, 258–265.

ICMSF (1986) Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. *Blackwell Scientific Publication* 2, 127–278. Disponível em <http://www.icmsf.org/pdf/icmsf2.pdf> Acedido em 12/07/16.

IFOAM (2011) EU Portugal Disponível em <http://www.ifoameu.org/en/portugal> Acedido em 15/07/16.  
Ignarro, L.J., Balestrieri, M.L., Napoli, C. (2007) Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovascular Research* 73,326–340.

Iqbal, A., Labib, M., Muharemagic, D., Sattar, S., Dixon, B. R., Berezovski, M. V. (2015) Detection of Cryptosporidium parvum oocysts on fresh produce using DNA aptamers. *PLoS ONE* 10(9), 1–13.

Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiology, *Sixth Edition, Aspen Publication, Maryland*, 635pp.

Jaykus, L.A. (1997) Epidemiology and Detection as Options for Control of Viral and Parasitic

Foodborne Disease. *In Emerging Infectious Diseases: Centers for Disease Control and Prevention* 3 (4), 529-539.

Júlio, C.M. (2012). Detecção, transmissão e diversidade genotípica de *Giardia duodenalis*. Tese de Doutoramento (Microbiologia) Lisboa: Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Júlio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., Nunes, B., Tenreiro, R., Ângelo, H. (2012) Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites & Vectors* 22 (5), 1-8.

Júlio, C. & Oleastro, M. (2014) Infecções gastrointestinais parasitárias em doentes sintomáticos : estudo observacional, *Boletim Epidemiológico* 37–40.

Jung, Y., Jang, H., Matthews, K.R. (2014) Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology* 7,517-527.

Kajiya, T., A. Kuroda, D. Hokonohara and C. Tei (2006) "Heart failure caused by hookworm infection possibly associated with organic food consumption." *International Medicine Journal* 45(13),827-829.

Kefalonia, F. & Effimia, E. (2015) Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Ready-to-Eat Foods in Kefalonia, Greece. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 6(5), 6–13.

King, L. A., Nogareda, F., Weill, F.-X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., Jourdan-Da Silva, N., Bingen, E. *et al.* (2012) "Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011". *Clinical Infectious Diseases* 54 (11),1588–1594.

Klapec, T. & A. Borecka. (2012)"Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19(3), 421-425.

Krometis, L. A., Characklis, G. W., Drummey, P. N., Sobsey, M. D. (2010) Comparison of the presence and partitioning behavior of indicator organisms and *Salmonella* spp. in an urban watershed. *Journal of Water Health* 8, 44-59.

Lambrecht, E., Baré, J., Van Damme, I., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K. (2013) Behavior of *Yersinia enterocolitica* in the presence of the bacterivorous *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6407–6413.

Lambrecht, E., Baré, J., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K. (2015) Protozoan cysts act as survival niche and protective shelter for foodborne pathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 81(16),5604-5612. <http://doi.org/10.1128/AEM.01031-15>

Leal, S.M.F. (2015) Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal. Tese de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica

de Lisboa.

Legua, P. & Seas, C. (2013) Cystoisospora and cyclospora. *Current Opinion in Infectious Diseases* 26(5), 479–483.

Lopez, C.E., Juranek, D.D., Sinclair, S.P., Schultz, M.G. (1978) Giardiasis in American travelers to Madeira Island, Portugal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27(6), 1128-1132.

Lund, B.M. (1992) Ecosystems in vegetable foods. *Journal of Applied Bacteriology* 73 (21), 115- 135.

Macpherson, C. N., Gottstein, B., Geerts, S. (2000) Parasitic food-borne and water-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique* 19(1), 240–258.

Maffei, D. F., Silveira, N. F. de A., Catanozi, M. da P. L. M. (2013) Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* 29(1), 226–230.

Maffei, D. F., Batalha, E. Y., Landgraf, M., Schaffner, D.W., Franco, B.D. (2013) Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology* 69, 1-7.

Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D. (2009) Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology* 69, 141–146.

Masucci, L., Graffeo, R., Bani, S., Bugli, F., Boccia, S., Nicolotti, N., Fiori, B., Frada, G., Spanu, T. (2011) Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 may 2006 to 31 december 2008. *Eurosurveillance* 16(24), 3–9.

McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Roger Couturier, M., Humphries, R. M. (2014) Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 52(3), 712–720. <http://doi.org/10.1128/JCM.02877-13>

McMahon, M. A. S. & Wilson, I. G. (2001) The occurrence of enteric pathogens and Aeromonas species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70(1-2), 155–162.

Medina, G., Flores-Martin, S., Fonseca, B., Otth, C., Fernandez, H. (2014) Mechanisms associated with phagocytosis of Arcobacter butzleri by Acanthamoeba castellanii. *Parasitology Research* 113, 1933–1942.

Melo Cristino, J.A.G., Carvalho, M.I.P., Salgado, M.J.(1998) An outbreak of cryptosporidiosis in a hospital day-care centre. *Epidemiology and Infection* 101, 355-359.

Melo, P.C., Teodósio, J., Reis, J., Duarte, A., Costa, J.C., Fonseca, I.P. (2006) Cryptosporidium spp. in freshwater bivalves in Portugal, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53 (1), 28–29.

Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* 21(2), 213–216.

Mohamed, M. A., Siddig, E. E., Elaagip, A. H., Edris, A. M. M., Nasr, A. A. (2016) Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 15(17) 1-7. <http://doi.org/10.1186/s12941-016-0133-5>

Monge, R., Chinchilla, M. (1996) Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *Journal of Food Protection* 59, 202–203.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L. (2003) Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infection, genetics and evolution: *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 3(1), 29–38.

Monis, P. T., Caccio, S.M., Thompson, R.C. (2009) Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology* 25,93–100.

Montanher, C.C.C., Coradin, D.C., Fontoura, S.E. da S. (2007) Avaliação parasitológica em alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. *Estudos de Biologia* 29, 63-73.

Motta, M. E. F. A. & Silva, G. A. P. Da. (2002) Diarréia por parasitas. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil* 2(2), 117–127.

Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzales, F. (2004) Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection* 67, 894-900.

Mukherjee, A., Speh, D., Diez-Gonzalez, F. (2007) Association of farm management practices with risk of *Escherichia coli* contamination in pre-harvest produce grown in Minnesota and Wisconsin. *International Journal of Food Microbiology* 120(3), 296-302.

Ng, P.J., Fleet, G.H. Heard, G.M. (2005) Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 101, 237–250.

Nguyen-the, C. & Carlin, F. (1994) The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 371–401.

Northrop-clewes, C. A. & Shaw, C. (2000) Parasites, *British Medical Bulletin* 56(1), 193–208.

NSW Food Authority (2009) Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. 11pp. Disponível

em [http://www.foodauthority.nsw.gov.au/\\_Documents/scienceandtechnical/microbiological\\_quality\\_guide\\_for\\_RTE\\_food.pdf](http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/scienceandtechnical/microbiological_quality_guide_for_RTE_food.pdf) Acedido em: 10/07/16.

Nyarango, R.M., Aloo, P.A., Kabiru, E.W., Nyanchongi, B.O. (2008) The risk of pathogenic intestinal parasite infections in Kisii Municipality, Kenya. *BMC Public Health* 8 (1),1-6.

Oberhuber, G., Kastner, N., Stolte, M. (1997) Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32, 48–51.

Orlandi, P. A., Chu, D. M. T., Bier, J. W., Jackson, G. J. (2002) Parasites and the food supply. *Food Technology* 56(4), 72–81.

Ortega, Y. R. & Sanchez, R. (2010) Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews* 23(1), 218–234. <http://doi.org/10.1128/CMR.00026-09>.

Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Certad, G. (2016) Correction: Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(4),1-17.

Pan, F., Li, X., Carabez, J., Ragosta, G., Fernandez, K.L., Wang, E., Thiptara, A., Antaki, E., Atwill, E.R. (2015) Cross-sectional survey of indicator and pathogenic bacteria on vegetables sold from Asian vendors at farmers' markets in northern California. *Journal of Food Protection* 78(3),602-608.

Patterson, D.J. (1996) Free-living Freshwater Protozoa: A Colour Guide. *Manson Publishing Ltd, London*,219 pp.

Pereira da Fonseca, I.M. (2000) Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

Pereira da Fonseca, I.M., Alonso, I., Catanho, H., Ramos, P., Ruano, F. E Fazendeiro, M.I. (2003) Impacto ambiental e zoonótico da criptosporidiose- Resumos do II Congresso dos Veterinários da Macaronésia, XII Encontro dos Médicos Veterinários dos Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde, Cabo Verde, Cidade da Praia, 20-24 de Outubro de 2003.

Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* 3, 537-546.

Pham, C.H., Min, J., Gu, M.B. (2004) Pesticide induced toxicity and stress response in bacterial cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 380–386.

Pinheiro, A. E., Ferreira, R., Leça, A. (2009) Abscesso Hepático Amebiano na Criança : Caso Clínico. *Revista Do Hospital de Crianças Maria Pia* 18, 146–148.

Prasad, K.K. (2013) Recent Insights into *Giardia lamblia* Infection. In: Infections of the Gastrointestinal System. Vaishnavi C. New Delhi, London, Philadelphia, Panama, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. 358-376pp.

Qadri, O. S., Yousuf, B., Srivastava, A. K., Yildiz, F. (2015) Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1-11. <http://doi.org/10.1080/23311932.2015.1121606>

Quadros, M.R., Marques, S.M.T., Favaro, D.A., Pessoa, V.B., Arruda, A.A.R.A., Santini, J.(2008) Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages -Santa Catarina. *Revista Ciência & Saúde* 1(2), 78–84.

Regulamento (CE) N.º 178/2002. Jornal Oficial da União Europeia,L31; Bruxelas, Bélgica. Disponível em <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:PT:PDF> Acedido em 13/07/15.

Ribas, P.P. & Matsumura, A.T.S. (2009) A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato* 10(14), 149-158.

Ribeiro, S., Furtado, C., Pereira, J. (2013) Association between cardiovascular disease and socioeconomic level in Portugal. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 32(11),847–854.

Rigo, C. R. & Franco, R. M. B. (2002) Comparison between the modified Ziehl-Neelsen and Acid-Fast-Trichrome methods for fecal screening of *Cryptosporidium parvum* and *Isospora belli*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(3), 209–214.

Robertson, L.J. & Gjerde, B., (2001) Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. *Journal of Food Protection* 64 (11), 1799–1805.

Robertson, L. J., Troell, K., Woolsey, I. D., Kapel, C. M. O. (2016) Fresh fruit, vegetables, and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in Europe: inferences and concerns from sample analysis data from Poland. *Parasitology Research* 115, 2485–2488.

Ryan, K.J. & Ray, C.G. (2004) Sherris Medical Microbiology, Fourth Edition, *Mc Graw Hill*, 979 pp.

Ryu, J.H., Kim, M., Kim, E.G., Beuchat, L.R., Kim, H. (2014) Comparison of the microbiological quality of environmentally friendly and conventionally grown vegetables sold at retail markets in Korea. *Journal of Food Science* 79, 1739–1744.

Salgado, M. & Gata, L. (2013) Parasitoses intestinais: ainda se deve fazer a desparasitação por rotina? Não! *Saúde Infantil* 35(3),145-148.



Sangaré, I., Bamba, S., Cissé, M., Zida, A., Bamogo, R., Sirima, C., Bienvenue, K., Yaméogo, K., Sanou, R., Drabo, F., Dabiré, R.K., Guiguemdé, R.T. (2015) Prevalence of intestinal opportunistic parasites infections in the University hospital of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Infectious Diseases of Poverty* 4(32),1-6. . <http://doi.org/10.1186/s40249-015-0065-x>

Santos, M. I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M. R., Nogueira, P. J., Pedroso, L., Ferreira, M. A. S. S. (2012) Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control* 23(1), 275–281. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.022>

Sativa (2004) Disponível em: <http://www.sativa.pt/canaais/channel.asp?id=142&lang=1>  
Acedido em 05/08/16.

Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W. (1983) Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203–206.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012) PCR inhibitors - occurrence, properties and removal . *Journal of Applied Microbiology* 113, 1014-1026.

Schuster, F. L. & Visvesvara, G. S. (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology* 126(1-2),91–120.

Schuster, F. L. & Ramirez-Avila, L. (2008) Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4), 626–638.

SCF (Scientific Committee on Food) (2002). *Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw expressed on 29 April 2002*. Disponível em [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf) Acedido em 12/07/15.

Serikstad, G. L., Loes, A.K., Brunberg, E., Grova, L., Steinshamn, Sorheim, K. (2015) Organic production and consumption in Norway – new knowledge through research and dissemination. *Nordic Association of Agricultural Scientists* 9 (3),93-94.

Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., De La Garza, M. (2013) Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebs as Virulence Factors. *Journal of Tropical Medicine* 2, 1-33. <http://doi.org/10.1155/2013/890603>

Sherchand, J. B., Sherchand, J. B., Cross, J. H. (2007) An epidemiological study of *Cyclospora cayentanensis* in Nepalese people. *Journal of Institute of Medicine* 29 (1), 8–13.

Shiratori, T. & Ishida, K. (2016) *Entamoeba marina* n. sp.; a New Species of *Entamoeba* Isolated from Tidal Flat Sediment of Iriomote Island, Okinawa, Japan. *Journal of Eukaryotic Microbiology*,63(3),280-286.

Silva, S.R.M., Maldonade, I.R., Ginani, V.C., Lima, S.A., Mendes, V.S., Azevedo, A.L.X., Gurgel-Gonçalves, R., Machado, E.R. (2014) Detection of intestinal parasites on field-grown strawberries in the Federal District of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47 (6), 801-805.

Smirnov, A. V. & Brown, S. (2004) Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology* 3(3), 148–190.

Smith, B. L. (1993) Organic foods vs. supermarket foods: element levels. *Journal of Applied Nutrition* 45 (1), 35-39.

Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A., Tait, A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology* 149, 29–40.

Solaymani-Mohammadi, S. & Petri, W. A. (2006) Zoonotic implications of the swine-transmitted protozoal infections. *Veterinary Parasitology* 140(3-4), 189–203.

Sorvillo, F. J., DeGiorgio, C., Waterman, S. H. (2007) Deaths from Cysticercosis, United States. *Emerging Infectious Diseases* 13(2), 230–235. <http://doi.org/10.3201/eid1302.060527>

Sprong, H., Caccio, S.M., van der Giessen, J.W.B. (2009) Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(12), 1-12.

Stark, D., Fotedar, R., Van Hal, S., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T., Harkness, J. (2007) Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(3), 549–552. <http://doi.org/76/3/549> [pii].

Szostakowska, B., W. Kruminis-Lozowska, M. Racewicz, R. Knight, L. Tamang, P. Myjak, T. K. Graczyk. (2004) *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3742–3744.

Takayanagui, O.M., Capuano, D.M., Oliveira, C.A.D., Bergamini, A.M.M., Okino, M.H.T., Silva, A.A.M.C., Oliveira, M.A., Ribeiro, E.G.A., Takayanagui, A.M.M. (2007) Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2), 239-241.

Tangtrongsup, S. & Scorza, V. (2010) Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine* 25(3), 155–162.

Tezcan-Merdol, D., Ljungstrom, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., Rhen, M. (2004) Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Applied Environmental Microbiology* 70, 3706–3714.

Tezer, H., Yuksek, S. K., Parlakay, A. özkaya, Gülhan, B., Tavail, B., Tunç, B. (2013) Evaluation of

cases with *Fasciola hepatica* infection: Experience in 6 children. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3(3), 211–216.

Thompson, R.C & Monis, P.T. (2011) Taxonomy of *Giardia* Species. In: *Giardia A model organism*. Luján H.D & Svärd S. *Austria, Springer Wien NewYork*. 3-16pp.

Uga, S., Hoa, N. T. V, Noda, S., Moji, K., Cong, L., Aoki, Y., Ray, S.K., Fujimaki, Y. (2009) Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. *Nepal Medical College Journal* 11(2), 75–78.

USDA (2014) Food Safety and Inspection Service. Office of Public Health Science. *Laboratory QA Staff*. Athens, 1-9pp.

Vaerewijck, M.J.M., Sabbe, K., Van Hende, J., Baré, J., Houf, K. (2010) Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1566–1578.

Vaerewijck, M.J.M., Sabbe, K., Baré, J., Houf, K. (2011) Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 147, 105–111.

Vaerewijck, M. J. M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., Houf, K. (2014) Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential Consequences for Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5), 924–944.

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., Borges, M., Fernandes, P. Nunes, S. (2009) Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. Ed. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Direcção de avaliação e comunicação dos riscos*, Lisboa, Portugal, 330pp.

Verweij, S. & Stensvold, R. (2014) Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* 27(2), 371–418.

Viegas, S. J. (2009) Alterações do estado de saúde associadas à alimentação : contaminação microbiológica dos alimentos: *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância*. Disponível [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao\\_INSA\\_online.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao_INSA_online.pdf) Acedido em 13/07/16.

Xiao, L., Ryan, U.M., Graczyk, T.K., Limor, J., Li, X., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, I.M., Zhou, L., Arrowood, M.J., Koudela, B., Modry, D., Lal, A.A. (2004) Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied Environmental Microbiology* 70, 891-899.

Xicohtencatl-Cortes, J., Sanchez, E., Saldana. Z., Freer, E., Giron, J.A. (2009) Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection* 72, 1531–1537.

Yeni, F., Yavaş, S., Alpas, H., Soyer, Y. (2015) Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (9), 1-47.

Zeibig, E. (2014) Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico- laboratorial, *Elsevier* 2ª edição, 392pp.

Zhou, X., Elmore, J., Call, D.R. (2007) Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environmental Microbiology* 9, 913–922.

Welch, D.B. & Meselson, M.S. (2001) Rates of nucleotide substitution in sexual and asexually reproducing rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6720–6724.

WHO (1998) Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review. *World Health Organization*. Geneva. Disponível em <http://apps.who.int/iris/handle/10665/64435> Acedido em 12/07/15.

WHO (2004) The world health report 2004: changing history: Geneva, 170pp. Disponível em [http://www.who.int/whr/2004/en/report04\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/whr/2004/en/report04_en.pdf?ua=1) Acedido em 12/07/16.

WHO(2016) Intestinal worms. Disponível em [http://www.who.int/intestinal\\_worms/more/en/](http://www.who.int/intestinal_worms/more/en/) Acedido em 05/05/16.

## **Anexos**

### **Anexo I- Logótipo Europeu para produtos de agricultura biológica**



## Anexo II - Espécies do género *Giardia* (Adaptado de Thompson & Monis, 2011)

Espécies	Hospedeiros	Características morfológicas	Trofozoítos comprimento/largura (µm)
<i>G. duodenalis</i> (=Genótipo A)	Grande variedade de mamíferos domésticos e selvagens; e também os humanos	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8
<i>G. agilis</i>	anfíbios	Trofozoítos longos e estreitos com corpos medianos claviformes	20-30/4-5
<i>G. muris</i>	roedores	Trofozoítos redondos, com corpos medianos arredondados	9-12/5-7
<i>G. ardeae</i>	pássaros	Trofozoítos redondos com entalhe proeminente no disco ventral e flagelo caudal rudimentar. Os corpos medianos são arredondados ou em forma de vírgula	~10/-6.5
<i>G. psittaci</i>	pássaros	Trofozoítos piriformes, sem simetria ventro-lateral. Corpos medianos em forma de vírgula	~14/~6
<i>G. microti</i>	roedores	Trofozoíto similar ao de <i>G. duodenalis</i>	12-15/6-8
<i>G. enterica</i> (=Genótipo B)	Humanos e outros primatas, cães, algumas espécies de mamíferos selvagens	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8
<i>G. canis</i> (=Genótipo C/D)	Cães e outros canídeos	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8
<i>G. cati</i> (=Genótipo F)	gatos	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8

<i>G. bovis</i> (=Genótipo E)	Gado e outros animais de rebanho	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8
<i>G. simondi</i> =(Genótipo G)	ratos	Trofozoítos piriformes com corpos medianos, em posição transversal e em forma de vírgula	12-15/6-8

**Anexo III- Índice de NMP e limites de confiança de 95% para combinações de tubos positivos numa série de diluição de 3 tubos utilizando quantidades de inóculo de 0.1, 0.01 e 0.001 g (ml). (Adaptado de USDA, 2014).**

Combinação de tubos positivos	NMP por g (ml)	Limite de Confiança 95%	
		Inferior	Superior
0-0-0	<3.0	---	9.5
0-0-1	3.0	0.15	9.6
0-1-0	3.0	0.15	11.
0-1-1	6.1	1.2	18.
0-2-0	6.2	1.2	18.
0-3-0	9.4	3.6	38.
1-0-0	3.6	0.17	18.
1-0-1	7.2	1.3	18.
1-0-2	11.	3.6	38.
1-1-0	7.4	1.3	20.
1-1-1	11.	3.6	38.
1-2-0	11.	3.6	42.
1-2-1	15.	4.5	42.
1-3-0	16.	4.5	42.
2-0-0	9.2	1.4	38.
2-0-1	14.	3.6	42.
2-0-2	20.	4.5	42.
2-1-0	15.	3.7	42.
2-1-1	20.	4.5	42.
2-1-2	27.	8.7	94.
2-2-0	21.	4.5	42.
2-2-1	28.	8.7	94.
2-2-2	35.	8.7	94.
2-3-0	29.	8.7	94.
2-3-1	36.	8.7	94.
3-0-0	23.	4.6	94.
3-0-1	38.	8.7	110.
3-0-2	64.	17.	180.
3-1-0	43.	9.0	180.
3-1-1	75.	17.	200.
3-1-2	120.	37.	420.
3-1-3	160.	40.	420.
3-2-0	93.	18.	420.
3-2-1	150.	37.	420.
3-2-2	210.	40.	430.
3-2-3	290.	90.	1000.
3-3-0	240.	42.	1000.
3-3-1	460.	90.	2000.
3-3-2	1100.	180.	4100.
3-3-3	>1100.	420.	---



**Anexo IV- Protocolo do Método de Faust (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco) utilizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa**

- 1º) Centrifugar a amostra com água destilada por um minuto a 2.500 rpm;
- 2ª) Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento em água destilada;
- 3º) Repetir as operações 1 e 2 até que o sobrenadante fique claro;
- 4º) Desprezar o sobrenadante claro e ressuspender o sedimento com uma solução de sulfato de zinco a 33%, densidade de 1,18g/ml;
- 5º) Centrifugar novamente por um minuto a 2.500 rpm;
- 6º) Os quistos e os ovos leves estarão presentes na película superficial; a mesma é recolhida com uma pipeta de Pasteur, colocada numa lâmina junta com uma gota de lugol e coberta com lamela.

**Anexo V – Protocolo de coloração Ziehl- Neelsen modificado (Casemore, 1991) utilizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa**

- 1º) Colocar os esfregaços secos num suporte sobre um tabuleiro;
- 2º) Cobrir os esfregaços com metanol durante 1 minuto, de modo a ocorrer a segunda fixação;
- 3º) Colocar o corante Fucsina sobre a lâmina, cobrindo todo o esfregaço e deixar actuar durante 10 minutos. Lavar a lâmina com água corrente;
- 4º) Proceder à descoloração cobrindo a lâmina com Ácido clorídrico a 1% e em seguida lavar com água corrente;
- 5º) Colocar o corante Verde Malaquite a 0,4% sobre a lâmina, cobrindo todo o esfregaço e deixar actuar durante 30 segundos. Passar novamente por água corrente;
- 6º) Deixar a lâmina secar num suporte, em posição vertical, até ficar completamente seca.

**Anexo VI - Protocolo de coloração Giemsa utilizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa**

- 1º) Colocar os esfregaços secos num suporte sobre um tabuleiro;
- 2º) Cobrir os esfregaços com metanol durante 1 minuto, de modo a ocorrer a segunda fixação;
- 3º) Colocar o corante Giemsa sobre a lâmina, cobrindo todo o esfregaço e deixar actuar durante 30 segundos a 1 minuto;
- 4º) Passar a lâmina sob água corrente, para retirar o excesso de corante;
- 5º) Deixar a lâmina secar num suporte, em posição vertical, até ficar completamente seca.

**Anexo VII- Resultados dos valores para coliformes termotolerantes (NMP/g)-origem convencional**

Hortalças Convencionais	Coliformes termotolerantes NMP/g	Presença de E. Coli (Teste do Indol)
Alface1	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Alface2	7,5 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface3	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Alface4	1,5 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface5	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Alface6	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Alface7	3,8 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface8	2,3 x10 <sup>1</sup>	Negativo
Alface9	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Alface10	3,6	Positivo
Agriao1	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Agriao2	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Agriao3	2,4 x10 <sup>2</sup>	Positivo
Agriao4	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Agriao5	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Agriao6	3	Negativo
Agriao7	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Agriao8	4,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Agriao9	4,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Agriao10	3	Negativo
Cebolinho1	4,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Cebolinho2	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho3	2,4 x10 <sup>2</sup>	Positivo
Cebolinho4	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho5	3,6	Negativo
Cebolinho6	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho7	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Cebolinho8	9,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Cebolinho9	3	Negativo
Cebolinho10	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Couve-galega 1	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Couve-galega 2	9,3 x10 <sup>1</sup>	Negativo
Couve-galega 3	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Couve-galega 4	2,1 x10 <sup>1</sup>	Negativo
Couve-galega 5	9,2	Negativo
Couve-galega 6	9,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Couve-galega 7	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Couve-galega 8	2,4 x10 <sup>2</sup>	Positivo
Couve-galega 9	3	Negativo

Couve-galega 10	3	Negativo
Espinafre1	<b><math>1,1 \times 10^3</math></b>	<b>Positivo</b>
Espinafre2	<b><math>1,1 \times 10^3</math></b>	<b>Positivo</b>
Espinafre3	$2,4 \times 10^2$	Positivo
Espinafre4	$9,3 \times 10^1$	Positivo
Espinafre5	9,2	Negativo
Espinafre6	<b><math>1,1 \times 10^3</math></b>	<b>Positivo</b>
Espinafre7	<b><math>1,1 \times 10^3</math></b>	<b>Positivo</b>
Espinafre8	$4,6 \times 10^2$	Positivo
Espinafre9	$4,6 \times 10^2$	Positivo
Espinafre10	$4,3 \times 10^1$	Positivo

**Anexo VIII- Resultados dos valores para coliformes termotolerantes (NMP/g)-origem biológica**

Hortalças Biológicas	Coliformes termotolerantes NMP/g	Presença de <i>E. Coli</i> (Teste do Indol)
Alface1	9,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Alface2	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Alface3	2,4 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface4	4,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface5	3,8 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Alface6	9,2	Negativo
Alface7	3	Negativo
Alface8	3	Negativo
Alface9	2,3 x10 <sup>1</sup>	Negativo
Alface10	3	Negativo
Agriao1	2,3 x10 <sup>1</sup>	Positivo
Agriao2	2,4 x10 <sup>1</sup>	Negativo
Agriao3	3,6	Positivo
Agriao4	3	Positivo
Agriao5	3	Negativo
Agriao6	2,4x10 <sup>2</sup>	Negativo
Agriao7	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Agriao8	3,6	Negativo
Agriao9	4,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Agriao10	2,4x10 <sup>2</sup>	Negativo
Cebolinho1	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho2	4,3x10 <sup>1</sup>	Positivo
Cebolinho3	2,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Cebolinho4	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho5	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho6	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Positivo</b>
Cebolinho7	3,8x10 <sup>1</sup>	Positivo
Cebolinho8	3,6	Negativo
Cebolinho9	7,4	Negativo
Cebolinho10	3	Negativo
Couve-galega1	1,5x10 <sup>1</sup>	Negativo
Couve-galega 2	3	Negativo
Couve-galega 3	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo
Couve-galega 4	4,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Couve-galega 5	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Negativo</b>
Couve-galega 6	4,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Couve-galega 7	7,5x10 <sup>1</sup>	Positivo
Couve-galega 8	3	Negativo
Couve-galega 9	3,6	Negativo
Couve-galega 10	3	Negativo
Espinafre1	4,6x10 <sup>2</sup>	Positivo

Espinafre2	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Negativo</b>
Espinafre3	4,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Espinafre4	<b>1,1x10<sup>3</sup></b>	<b>Negativo</b>
Espinafre5	3	Negativo
Espinafre6	2,3x10 <sup>1</sup>	Negativo
Espinafre7	3	Negativo
Espinafre8	3	Negativo
Espinafre9	3	Negativo
Espinafre10	3	Negativo

### Anexo IX- Frequência de protozoários e nemátodes em vegetais de origem biológica

	Alface (n=10)		Agrião (n=10)		Cebolinho (n=10)		Couve (n=10)		Espinafre (n=10)		Total	Forma parasitária	Frequência total (N=50)
	N	F	N	F	N	F	N	F	N	F			
<i>Entamoeba coli</i>	0	0%	0	0%	0	0%	1	10%	0	0%	1	Quisto	2%
<i>Entamoeba</i> spp.	4	40%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	5	Quisto	10%
<i>Paramecium</i> spp.	2	20%	3	30%	0	0%	3	30%	4	40%	12	Trofozoíto	24%
<i>Colpoda</i> spp.	2	20%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	3	Trofozoíto	6%
Flagelado de vida livre	0	0%	0	0%	0	0%	2	20%	0	0%	2	Trofozoíto	4%
Ciliado de vida livre	1	10%	4	40%	0	0%	0	0%	1	10%	6	Trofozoíto	12%
<i>Amoeba</i> spp.	2	20%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	Trofozoíto	4%
<i>Balantidium</i> spp.	2	20%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	3	Trofozoíto e quisto	6%
Larva de nemátode de vida livre	1	10%	0	0%	1	10%	0	0%	0	0%	2	Larva	4%
Ovo de nemátode de vida livre	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	Ovo	0%

n= Número de vegetais por cada variedade amostrada

N= Número total de amostras

F= Frequência



## Anexo X- Frequência de protozoários e nemátodes em vegetais de origem convencional

	Alface (n=10)		Agrião (n=10)		Cebolinho (n=10)		Couve (n=10)		Espinafre (n=10)		Total	Forma parasitária	Frequência total (N=50)
	N	F	N	F	N	F	N	F	N	F			
<i>Entamoeba coli</i>	0	0	0	0%	0	0%	0	0%	1	10%	1	Quisto	2%
<i>Entamoeba</i> spp.	0	0%	2	20%	2	20%	0	0%	0	0%	4	Quisto	8%
<i>Paramecium</i> spp.	2	20%	2	20%	0	0%	0	0%	1	10%	5	Trofozoíto	10%
<i>Colpoda</i> spp.	0	0%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	1	Trofozoíto	2%
Flagelado de vida livre	3	30%	3	30%	1	10%	2	20%	0	0%	9	Trofozoíto	18%
Ciliado de vida livre	1	10%	2	20%	0	0%	1	10%	1	10%	5	Trofozoíto	10%
<i>Amoeba</i> spp.	1	10%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	2	Trofozoíto	4%
<i>Balantidium</i> spp.	1	10%	1	10%	2	20%	0	0%	0	0%	4	Trofozoíto e quisto	8%
Larva de nemátode de vida livre	0	0%	0	0%	3	30%	0	0%	2	20%	5	Larva	10%
Ovo de nemátode de vida livre	0	0%	1	10%	3	30%	0	0%	2	20%	6	Ovo	12%

n= Número de vegetais por cada variedade amostrada

N= Número total de amostras

F= Frequência